

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/31, 15/70, 15/62, C07K 14/32, C12N 1/21, A61K 39/07</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/28263</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>7. August 1997 (07.08.97)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP97/00432</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>31. Januar 1997 (31.01.97)</b>			
(30) Prioritätsdaten: <b>196 03 649.6 1. Februar 1996 (01.02.96) DE</b>			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: <b>LUBITZ, Werner [AT/AT]; Schönborngasse 12/7, A-1080 Wien (AT). SLEYTR, Uwe [AT/AT]; Parhamerplatz 10, A-1170 Wien (AT).</b>			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfänger/Anmelder (nur für US): <b>KUEN, Beatrix [AT/AT]; Kaiserstrasse 107/21, A-1070 Wien (AT). TRUPPE, Michaela [AT/AT]; Tulpenstrasse 6, A-4222 Luftenberg (AT). HOWORKA, Stefan [AT/AT]; Hietzinger Hauptstrasse 42d/b, A-1130 Wien (AT). RESCH, Stepanka [AT/AT]; Kranzgasse 7/28, A-1150 Wien (AT). SCHROLL, Gerhard [AT/AT]; Maria Hilferstrasse 110/6, A-1070 Wien (AT). SARA, Margit [AT/AT]; Watzekgasse 84, A-2230 Gänserndorf (AT).</b>			
(74) Anwälte: <b>WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D- 81679 München (DE).</b>			
<b>(54) Titel: RECOMBINANT EXPRESSION OF S-LAYER PROTEINS</b>			
<b>(54) Bezeichnung: REKOMBINANTE EXPRESSION VON S-LAYER-PROTEINEN</b>			
<b>(57) Abstract</b>			
The invention concerns processes for the recombinant preparation of S-layer proteins in gram-negative host cells. In addition, the nucleotide sequence of a new S-layer gene and a process for preparation of modified S-layer proteins is disclosed.			
<b>(57) Zusammenfassung</b>			
Die Erfindung betrifft Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen in gram-negativen Wirtszellen. Weiterhin werden die Nukleotidsequenz eines neuen S-Layer-Gens und Verfahren zur Herstellung modifizierter S-Layer-Proteine offenbart.			

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereiniges Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

**Rekombinante Expression von S-Layer-Proteinen****Beschreibung**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen und modifizierten S-Layer-Proteinen in gram-negativen Wirtszellen.

10 Kristalline bakterielle Zelloberflächenlayer (S-Layer) bilden in vielen Eubakterien und den allermeisten Archaeabakterien die äußerste Zellwandkomponente (Sleytr et al. (1988), Crystalline Bacterial Cell Surface Layers, Springer Verlag Berlin; Messner und Sleytr, Adv.Mikrob.Physiol.33 (1992), 213-275). Die meisten der gegenwärtig bekannten S-Layer-Proteine sind aus identischen Proteinen bzw. Glykoproteinen zusammengesetzt, die scheinbare Molekulargewichte im Bereich von 40 000 bis 220 000 aufweisen. Die Komponenten von S-Layern sind selbst-assemblierend und die meisten Gitter haben eine schräge (p2), quadratische (p4) oder hexagonale (p6) Symmetrie. Die Funktionen von bakteriellen S-Layern sind immer noch nicht vollständig bekannt, aber aufgrund ihrer Lokalisierung an der Zelloberfläche dürften die porösen kristallinen S-Layer hauptsächlich als Schutzhüllen, Molekularsiebe oder zur Förderung der Zelladhäsion und Oberflächenerkennung dienen.

Genetische Daten und Sequenzinformationen sind für verschiedene S-Layer-Gene aus Mikroorganismen bekannt. Eine Übersicht findet sich bei Peyret et al., Mol.Mikrobiol.9 (1993), 97-109. Auf diese Daten wird ausdrücklich Bezug genommen. Die Sequenz des für das S-Layer-Protein von *B.stearothermophilus* PV72 kodierenden Gens *sbsA* und ein Verfahren zu dessen Klonierung sind bei Kuen et al. (Gene 145 (1994), 115-120) angegeben.

35 *B.stearothermophilus* PV72 ist ein gram-positives Bakterium, das mit einem hexagonal angeordneten S-Layer bedeckt ist. Die Hauptkomponente des S-Layer ist ein 128 kd-Protein, bei dem es

- 2 -

sich um das häufigste Protein in der Zelle mit einem Anteil von ungefähr 15% bezüglich der gesamten Proteinbestandteile handelt. Es sind verschiedene Stämme von *B.stearothermophilus* charakterisiert worden, die hinsichtlich des Typs von S-Layer-Gitter, dem Molekulargewicht und der Glykosilierung der S-Layer-Komponenten unterschiedlich sind (Messner und Sleyter (1992), *supra*).

Die deutsche Patentanmeldung P 44 25 527.6 offenbart den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt des S-Layer-Gens aus *B.stearothermophilus* und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein befindet sich zwischen Position 30 und 31 der Aminosäuresequenz. Die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure kann operativ mit einer Protein-kodierenden Nukleinsäure verknüpft werden und zur rekombinanten Herstellung von Proteinen in einem Verfahren verwendet werden, bei dem man eine transformierte Wirtszelle bereitstellt, die Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung und Sekretion des davon kodierten Polypeptids führen, und das resultierende Polypeptid aus dem Kulturmedium gewinnt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise prokaryontische Organismen, insbesondere gram-positive Organismen der Gattung *Bacillus* genannt.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die rekombinante Herstellung von S-Layer-Proteinen nicht nur in gram-positiven prokaryontischen Wirtszellen, sondern auch in gram-negativen prokaryontischen Wirtszellen möglich ist. Dabei bildet sich das S-Layer-Protein im Inneren der Wirtszelle nicht in Form von ungeordneten Einschlußkörpern, sondern unerwarteterweise in Form von geordneten monomolekularen Schichten.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man (a) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit

- 3 -

- einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure, ausgewählt aus (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, (ii) 5 einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt; 10 (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle gewinnt.
- 15 Unter dem Begriff "stringente Hybridisierung" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man, daß eine Hybridisierung auch nach Waschen bei 55°C, vorzugsweise 60°C, in einem wäßrigen Niedrigsalz-Puffer (z.B. 0,2 xSSC) noch auftritt (s. auch Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory 20 Manual).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in gram-negativen prokaryontischen Wirtszellen durchgeführt. Dabei wird überraschenderweise im Zellinneren eine geordnete S-Layer-Proteinstruktur erhalten. Vorzugsweise werden als Wirtszellen Enterobakterien, insbesondere E.coli, verwendet. Besonders bevorzugt ist der E.coli-Stamm pop2125, der am 31.01.1996 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D 38124 Braunschweig unter dem Aktenzeichen DSM 30 10509 hinterlegt wurde.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur Gewinnung rekombinanter S-Layer-Proteine eingesetzt werden. Hierzu verwendet man eine für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure, die 35 eine oder mehrere Insertionen enthält, die für Peptid- oder Polypeptidsequenzen kodieren. Diese Insertionen können einerseits nur für Peptide mit wenigen Aminosäuren, z.B. 1-25 Ami-

- 4 -

nosäuren, kodieren. Andererseits können die Insertionen auch für größere Polypeptide von z.B. bis zu 1000 Aminosäuren und vorzugsweise bis zu 500 Aminosäuren kodieren, ohne daß die Fähigkeit des S-Layer-Proteins zur Ausbildung einer korrekt gefalteten Struktur verlorengeht. Neben den Insertionen kann das rekombinante S-Layer-Protein auch Aminosäuresubstitutionen, insbesondere Substitutionen einzelner Aminosäuren im Bereich der Insertionsorte sowie gegebenenfalls Deletionen einzelner Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte von bis zu 30 Aminosäuren aufweisen.

Als Insertionsstellen für Polypeptid-kodierende Sequenzen bevorzugt sind Bereiche zwischen den Positionen 1-1200 und 2200-3000 der in SEQ ID NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz. Besonders bevorzugte Insertionsstellen sind die NruI-Schnittstelle an Position 582, die PvuII-Schnittstelle an Position 878, die SnaB-I-Schnittstelle an Position 917, die PvuII-Schnittstelle an Position 2504 und die PvuII-Schnittstelle an Position 2649. Die Insertion einer für Streptavidin kodierenden Nukleinsäuresequenz konnte bereits in die NruI-Schnittstelle an Position 581 gezeigt werden.

Die Peptid- oder Polypeptid-kodierenden Insertionen werden vorzugsweise ausgewählt aus Nukleotidsequenzen, die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren geladenen Aminosäuren, z.B. Arg, Lys, Asp oder Glu, oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epitope, antigene, allergene oder immunogene Epitope, metallbindende Epitope, Streptavidin, Enzyme, Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine kodieren.

Ein besonders bevorzugtes Beispiel für eine Insertion in die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ist eine für Streptavidin kodierende Nukleotidsequenz. Auf diese Weise können universelle Trägermoleküle erhalten werden, die zur Ankopplung von biotinylierten Reagenzien und zum Nachweis in immunologischen oder Hybridisierungstestverfahren geeignet sind.

- 5 -

Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für Insertionen sind antigenen allergene oder immunogene Epitope, z.B. Epitope aus pathogenen Mikroorganismen, wie etwa Bakterien, Pilzen, Parasiten etc. und Viren, oder Epitope aus Pflanzen oder Epitope gegen körpereigene Substanzen, z.B. Cytokine, sowie gegen Toxine, insbesondere Endotoxine. Besonders bevorzugte Beispiele für immunogene Epitope sind Epitope aus Herpesviren, wie etwa Herpesvirus 6 oder Pseudorabiesvirus (Lomniczi et al., J. Virol. 49 (1984), 970-979), insbesondere Epitope aus den Genen gB, gC oder/und gD, oder Maul- und Klauenseuchevirus (FMDV), insbesondere Epitope aus den Genabschnitten, die für VP1, VP2 oder/und VP3 kodieren. Die immunogenen Epitope können so ausgewählt werden, daß sie die Erzeugung einer Antikörpervermittelten Immunreaktion fördern oder/und die Erzeugung einer zellulären Immunreaktion, z.B. durch Stimulation von T-Zellen, fördern. Beispiele für geeignete allergene Epitope sind Birkenpollenallergene, z.B. Bet v I (Ebner et al., J. Immunol. 150 (1993) 1047-1054). Weiterhin besonders bevorzugt sind antigenen Epitope, die in der Lage sind, aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten körpereigene oder körperfremde Substanzen wie etwa Cytokine oder Toxine zu binden und herauszufiltrieren. Derartige Epitope können Bestandteile von Cytokin- oder Toxinrezeptoren oder von Antikörpern gegen Cytokine oder Toxine umfassen.

25

Andererseits können die Insertionen auch für Enzyme kodieren. Bevorzugte Beispiele sind Enzyme zur Synthese von Polyhydroxybuttersäure, z.B. PHB-Synthase. Durch Einbau von PHB-Synthase in den S-Layer kann bei Zufuhr des Substrats Hydroxybuttersäure unter geeigneten Bedingungen eine molekulare Spinndüse entstehen. Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für ein Enzym ist bakterielle Luciferase. Hier kann bei Zufuhr des Enzymsubstrates, eines Aldehyds, und in Anwesenheit von O<sub>2</sub>, ein molekularer Laser erhalten werden.

35

Ebenfalls bevorzugt sind Insertionen, die für Cytokine, wie etwa Interleukine, Interferone oder Tumornekrosefaktoren ko-

- 6 -

dieren. Diese Moleküle können beispielsweise in Kombination mit immunogenen Epitopen zur Herstellung von Vakzinen verwendet werden.

- 5 Schließlich sind auch Insertionen bevorzugt, die für Antikörper-bindende Proteine, wie etwa Protein-A oder Protein-G oder für DNA- oder/und metallbindende Epitope, wie etwa Leucin-Zipper, Zinkfinger etc. kodieren.
- 10 So wird durch die vorliegende Erfindung erstmals eine Zelle bereitgestellt, die im Cytoplasma immobilisierte rekombinante Polypeptide in nativer Form, z. B. aktive Enzyme enthält. Pro m<sup>2</sup> rekombinannten S-Layer können auf diese Weise 50.000 - 200.000, z. B. ca. 100.000 rekombinante Moleküle immobilisiert  
15 werden. Pro kg rekombinante E.coli Zellen können bis zu 3.000 m<sup>2</sup> S-Layer erhalten werden.

Vorzugsweise wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure in operativer  
20 Verknüpfung mit einer für ein Signalpeptid von gram-positiven Bakterien kodierenden Nukleinsäure verwendet, d.h. 5'-seitig von der S-Layer-Protein-kodierenden Nukleinsäure ist die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure angeordnet. Überraschenderweise wurde nämlich festgestellt, daß die Anwesenheit derartiger Signalpeptidsequenzen, die in den erfindungsgemäß verwendeten gram-negativen Wirtszellen nicht abgespalten werden, die Stabilität der S-Layer-Strukturen verbessern kann. Besonders bevorzugt umfaßt die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure (a) den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID  
30 NO. 1 dargestellten Nukleotidsequenz, (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder/und (c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% homologe Nukleotidsequenz.

35

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein rekombinantes S-Layer-Protein

- 7 -

kodiert und ausgewählt ist aus (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der 5 Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

10

In SEQ ID NO.1 ist die kodierende Nukleotidsequenz des S-Layer-Gens sbsA aus *B.stearothermophilus* einschließlich des Signalpeptid-kodierenden Abschnitts gezeigt. Der Signalpeptid-kodierende Abschnitt reicht von Position 1-90 der in SEQ ID 15 NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz. Der für das reife SbsA-Poly-peptid kodierende Abschnitt reicht von Position 91-3684.

Das sbsA-Gen von *B.stearothermophilus* kodiert für ein Protein mit insgesamt 1228 Aminosäuren einschließlich eines N-termina-20 len Signalpeptids mit 30 Aminosäuren (SEQ ID NO.2). Die Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein befindet sich zwischen Position 30 und 31 der Aminosäuresequenz. Das Signalpeptid weist eine basische aminoterminale Domäne, gefolgt von einer hydrophoben Domäne, auf.

25

Sequenzvergleiche mit anderen Signalpeptiden zeigen eine gewisse Homologie zu Signalpeptiden von extrazellulären Proteinen in Bazillen, wie etwa alkalische Phosphatase und neutrale Phosphatase von *B.amyloliquefaciens* (Vasantha et al., J.Bacteriol.159 (1984), 811-819) sowie mit den Signalpeptiden für das *B.sphaericus*-Gen 125 (Bowditch et al., J.Bacteriol.171 (1989), 4178-4188) und das OWP-Gen von *B.brevis* (Tsuboi et al., J.Bacteriol.168 (1986), 365-373).

35 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinanter Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Der Vektor ist vorzugsweise

- 8 -

in Prokaryonten replizierbar. Besonders bevorzugt ist der Vektor ein prokaryontisches Plasmid.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einer Nukleinsäure oder einem rekombinanten Vektor gemäß vorliegender Erfindung transformiert ist. Vorzugsweise ist die Zelle ein gram-negativer prokaryontischer Organismus und am meisten bevorzugt eine E.coli-Zelle. Die erfindungsgemäße Zelle kann in ihrem Inneren eine rekombinante S-Layerstruktur enthalten. Verfahren zur Transformation von Zellen mit Nukleinsäuren sind allgemeiner Stand der Technik (siehe Sambrook et al., supra) und brauchen daher nicht erläutert zu werden.

15 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinantes S-Layer-Protein, das innerhalb der in SEQ ID NO.2 gezeigten Aminosäuresequenz mindestens eine Peptid- oder/und Polypeptidinsertion enthält. Bevorzugte Beispiele für Peptid- und Polypeptidinsertionen wurden bereits erläutert.

20 Aus erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layer-Proteinmolekülen kann eine rekombinante S-Layer-Struktur assembliert werden, die als Untereinheit mindestens ein erfindungsgemäßes rekombinantes S-Layer-Protein enthält. Weiterhin ist bevorzugt, daß 25 die erfindungsgemäße S-Layer-Struktur als "Verdünnungsmoleküle" auch nichtmodifizierte S-Layer-Proteine enthält. Die nichtmodifizierten S-Layer-Proteine liegen vorzugsweise in einem molaren Anteil von 10-99% bezüglich der gesamten S-Layer-Proteine vor.

30 Die erfindungsgemäße S-Layer-Struktur kann mehrere kovalent oder durch Affinitätsbindung miteinander verknüpfte Schichten umfassen. Kovalente Verknüpfungen können beispielsweise durch Insertionen von Cysteinresten und einer anschließenden Ausbildung von Cystinbrücken eingeführt werden. Verknüpfungen durch Affinitätsbindung umfassen beispielsweise Antikörper-

- 9 -

Antigen-, Antikörper-Protein A- bzw. -Protein G- oder Streptavidin-Biotin-Wechselwirkungen.

S-Layer-Strukturen, die rekombinante S-Layer-Proteine enthalten, können gegebenenfalls auch in trägergebundener Form hergestellt werden. Hierzu kann die Reassemblierung der S-Layer-Struktur aus einzelnen Einheiten in Gegenwart eines Peptidoglycanträgers erfolgen, wobei beispielsweise Peptidoglycanschichten erzeugt werden, die auf einer oder auf beiden Seiten mit einer S-Layer-Struktur überzogen sind. Eine andere Möglichkeit zur Herstellung trägergebundener S-Layer-Strukturen besteht darin, eine S-Layer-Schicht an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien, z.B. Wasser/Luft, zu erzeugen und diese Schicht auf einer Festphase, z.B. einer Filtermembran, zu immobilisieren (vgl. z.B. Pum und Sleytr (1994), Thin Solid Films 244, 882-886; Küpcü et al. (1995), Biochim. Biophys. Acta 1235, 263-269).

Die erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layer-Proteine und S-Layer-Strukturen sind für eine Vielzahl von Anwendungen geeignet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung als Vakzin oder Adjuvans, wobei man rekombinante S-Layer-Proteine verwendet, die immunogene Epitope von Pathogenen und/oder körpereigene immunstimulierende Polypeptide, wie etwa Cytokine, enthalten. Bei dieser Anwendung ist nicht unbedingt eine Reinigung der rekombinanten S-Layer-Proteine erforderlich. Stattdessen kann beispielsweise die Verwendung in Kombination mit einem Bakterienghost erfolgen, der ggf. in seiner Membran zusätzliche immunogene Epitope enthält.

30

Die Herstellung geeigneter "Bakterienghosts" ist beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP91/00967 beschrieben, auf die hiermit Bezug genommen wird. Dort werden modifizierte Bakterien offenbart, erhältlich durch Transformation eines gram-negativen Bakteriums mit dem Gen eines lytisch wirkenden Membranproteins aus Bakteriophagen, mit dem Gen eines lytisch wirkenden Toxin-Freisetzungsproteins oder mit

- 10 -

Genen, die Teilsequenzen davon, die für lytische Proteine kodieren, enthalten, Kultivierung des Bakteriums, Expression dieses Lyse-Gens und Isolierung des resultierenden Bakterienghosts aus dem Kulturmedium.

5

An die Membran dieser Bakterien kann, wie im europäischen Patent 0 516 655 beschrieben, ein rekombinantes Protein gebunden sein, das durch Expression einer rekombinanten DNA in diesen gram-negativen Bakterien erhältlich ist. Diese rekombinante DNA umfaßt eine erste DNA-Sequenz, welche für eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne, die eine  $\alpha$ -helikale Struktur besitzt und aus 14-20 Aminosäuren besteht, die N- und C-terminal von je 2-30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein können, kodiert. Mit dieser ersten DNA-Sequenz in operativer Verknüpfung befindet sich eine zweite DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes rekombinantes Protein kodiert. Weiterhin enthält das gram-negative Bakterium eine dritte DNA-Sequenz, die unter einer von den ersten und zweiten DNA-Sequenzen getrennten Kontrolle steht und für ein 10 lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-Freisetzungsprotein oder für deren lytisch wirkende Teile kodiert. Durch Expression und Lyse derartiger rekombinanter, gram-negativer Bakterien werden sog. "Bakterienghosts" erhalten, die eine intakte Oberflächenstruktur mit an die Oberfläche gebundenen immunogenen Epitopen 15 enthalten.

20

25

Bei Kombination dieser Bakterienghosts mit erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layern können Vakzine und Adjuvantien erzeugt 30 werden, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen.

Eine weitere besonders bevorzugte Verwendung für rekombinante S-Layer-Proteine und S-Layer Strukturen ist die Verwendung als Enzymreaktor. Ein solcher Enzymreaktor kann beispielsweise von 35 einer Zelle gebildet werden, die in ihrem Inneren eine erfindungsgemäße rekombinante S-Layer-Struktur enthält. Andererseits kann der Enzymreaktor auch aus isolierten und in vitro

- 11 -

reassemblierten S-Layer-Strukturen oder Kombinationen verschiedener S-Layer-Strukturen gebildet werden.

Es wurde festgestellt, daß das gram-positive Bakterium *B.stearothermophilus* PV72 neben SbsA noch ein weiteres S-Layer-Protein enthält, das in der Folge als SbsB bezeichnet wird. (Sara und Sleytr (1994), J. Bacteriol. 176, 7182-7189). Durch Amplifikation unter Verwendung geeigneter Nukleinsäureprimer konnte das sbsB-Gen isoliert und charakterisiert werden. In SEQ ID NO.5 ist die kodierende Nukleotidsequenz des S-Layer-Gens sbsB aus *B.stearothermophilus* einschließlich des Signalpeptid-kodierenden Abschnitts, der von Position 1-93 der Nukleinsäuresequenz reicht, gezeigt. In SEQ ID NO.6 ist die davon abgeleitete Aminosäuresequenz gezeigt. Das sbsB-Gen kodiert für ein Protein mit insgesamt 921 Aminosäuren einschließlich eines N-terminalen Signalpeptids mit 31 Aminosäuren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

Ebenso wie beim sbsA-Gen kann auch beim sbsB-Gen innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine für ein Peptid oder Polypeptid kodierende Nukleinsäureinsertion eingefügt werden. Bezuglich bevorzugter Beispiele für Insertionen im sbsB-Gen wird auf die zuvor gemachten Ausführungen hinsichtlich des sbsA-Gens verwiesen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie eines sbsB-Gens gegebenenfalls mit Insertion enthält. Dieser Vektor kann in Eukaryonten, Prokaryonten oder in Eukaryonten und Prokaryonten replizierbar sein. Er kann in ein das Genom der Wirtszelle integrierbarer Vektor oder ein Vektor sein, der extrachromosomal vorliegt. Vorzugsweise ist der erfindungsgemäße Vektor ein Plasmid, insbesondere ein prokaryontisches Plasmid.

10 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einem sbsB-Gen transformiert ist, wobei das sbsB-Gen gegebenenfalls eine Insertion enthalten kann. Die Wirtszelle kann sowohl eine eukaryontische als auch 15 eine prokaryontische Zelle sein. Vorzugsweise ist die Zelle ein prokaryontischer Organismus. Sowohl gram-positive Organismen, z.B. Organismen der Gattung Bacillus, als auch gram-negative Organismen, wie etwa Enterobakterien, insbesondere E.coli, sind bevorzugt. Verfahren zur Transformation von eukaryontischen und prokaryontischen Zellen mit Nukleinsäuren sind 20 bekannt und brauchen daher nicht ausführlich erläutert werden.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein SbsB-Protein, d.h. ein S-Layer-Protein, das von einer Nukleinsäure, wie vorstehend definiert kodiert ist. Besonders bevorzugt sind 25 rekombinante SbsB-Proteine, die eine oder mehrere Peptid- oder/und Polypeptidinsertionen innerhalb der sbsB-Sequenz enthalten. Besonders bevorzugt weist der SbsB-Anteil eines erfindungsgemäßen Polypeptids eine Homologie von mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% zu der in SEQ ID NO.6 30 gezeigten Aminosäuresequenz auf.

Auch aus den rekombinanten SbsB-S-Layer-Proteinmolekülen kann eine rekombinante S-Layer-Struktur entsprechend der rekombinanten SbsA-S-Layer-Struktur assembliert werden. In dieser 35 Struktur liegen die nichtmodifizierten S-Layerproteine vorzugsweise in einem molaren Anteil von 10-99% bezüglich der gesamten S-Layer-Proteine vor.

Auch die Anwendungen der erfindungsgemäßen rekombinanten sbsB-S-Layer-Proteine und S-Layer-Strukturen entsprechen den vorstehend für SbsA genannten Anwendungen. Insbesondere ist dabei die Verwendung als Vakzin oder Adjuvans bzw. als Enzymreaktor bemerkenswert.

Rekombinante S-Layer-Proteine sind erhältlich durch ein Verfahren, bei dem man

- (a) eine Wirtszelle bereitstellt, die eine für ein S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure enthält, die innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält,
- (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen, und
- (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle oder dem Kulturmedium gewinnt.

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens wird ein rekombinantes SbsA-S-Layer-Protein hergestellt, d.h. die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure wird ausgewählt aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID No.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform wird ein rekombinantes SbsB-S-Layer-Protein hergestellt, d.h. die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure wird ausgewählt aus

- 14 -

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- 5 (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

Neben den rekombinanten SbsA und SbsB-S-Layer-Proteinen aus *B.stearothermophilus* können jedoch auch rekombinante S-Layer-Proteine aus anderen Organismen (vgl. z.B. Peyret et al., 15 supra) hergestellt werden.

Die Herstellung der rekombinanten S-Layer-Proteine kann einerseits in einer heterologen Wirtszelle erfolgen, d.h. in einer Wirtszelle, die ursprünglich kein S-Layer-Gen enthält. Beispiele für solche heterologen Wirtszellen sind gram-negative prokaryontische Organismen, wie etwa *E.coli*.

Die heterologe Expression von S-Layer-Proteinen kann jedoch auch in gram-positiven prokaryontischen Organismen, wie etwa *B. subtilis*, erfolgen. Hierzu werden vorzugsweise Integrationsvektoren verwendet, die ein natives oder/und ein rekombinantes S-Layer-Gen enthalten. Bei Verwendung der nativen Signalsequenzen wird eine Sekretion der S-Layer-Proteine in den Kulturüberstand gebunden.

Oft ist jedoch die Herstellung der rekombinanten S-Layer-Proteine in homologen Wirtszellen bevorzugt, d.h. in Wirtszellen, die ursprünglich ein natürliches S-Layer-Gen enthalten. In einer Ausführungsform dieser homologen Expression wird das 25 rekombinante S-Layer-Gen in die Wirtszelle so eingeführt, daß die Wirtszelle noch in der Lage ist, ein weiteres S-Layer-Gen zu exprimieren, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein

- 15 -

- kodiert. Vorzugsweise ist das nichtmodifizierte S-Layer-Protein in der Lage, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden. Ein Beispiel für diese Ausführungsform der homologen Expression ist eine 5 B.stearothermophilus PV72 Zelle, welche intakte natürliche sbsA- oder/und sbsB-Gene enthält, und die mit einem Plasmid transformiert ist, welches ein rekombinantes S-Layer-Gen ent-hält.
- 10 In einer zweiten Ausführungsform kann die homologe Expression in einer Wirtszelle erfolgen, in der das ursprünglich vorhandene intakte S-Layer-Gen inaktiviert wurde. Folglich wird in dieser Ausführungsform in der Wirtszelle kein weiteres S-Layer-Gen mehr exprimiert, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert, welches in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden. Ein spezifisches Beispiel für eine derartige Wirtszelle ist eine B.stearothermophilus PV72 Zelle, in deren Genom z.B. durch homologe Rekombination ein für ein rekombinantes S-Layer-Protein kodierendes Gen eingeführt wurde, welches das ursprüngliche S-Layer-Gen ersetzt. Ein weiterer Bei-15 spiel für eine derartige Wirtszelle ist eine B.stearothermo-philus-Zelle, in der das native S-Layer-Gen z.B. durch orts-spezifische Mutagenese oder/und homologe Rekombination inakti-20 viert wurde und die mit einem ein rekombinantes S-Layer-Gen enthaltenden Vektor transformiert ist.
- 25

Bei der homologen Expression rekombinanter S-Layer-Gene werden als Wirtszellen üblicherweise gram-positive prokaryontische 30 Organismen verwendet. Besonders bevorzugt als Wirtszelle ist B.stearothermophilus PV72, der bei hoher Temperatur in einem definierten synthetischen Medium (Schuster et al., (1995), Biotechnol. and Bioeng. 48: 66-77) kultiviert werden kann.

- 16 -

Weiterhin wird die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert. Es zeigen:

- SEQ ID NO.1 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden Abschnitts des S-Layer-Gens sbsA von *B.stearothermophilus*;  
5 SEQ ID NO.2 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;  
SEQ ID NO.3 die Nukleotidsequenz des Primers T5-X;  
SEQ ID NO.4 die Nukleotidsequenz des Primers E;  
10 SEQ ID NO.5 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden Abschnitts des S-Layer-Gens sbsB von *B.stearothermophilus*;  
SEQ ID NO.6 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;  
SEQ ID NO.7 die Nukleotidsequenz eines Teilfragments des Streptavidingens;  
15 SEQ ID NO.8 die Nukleotidsequenz des Primers NIS 2AG;  
SEQ ID NO.9 die Nukleotidsequenz des Primers LIS C3;  
Fig.1 eine schematische Darstellung des zur Herstellung des rekombinanten Vektors pBK4 verwendeten sbsA PCR-Fragments;  
20 Fig.2 eine schematische Darstellung von Peptidinsertionen in die Aminosäuresequenz des SbsA S-Layer-Proteins und  
Fig.3 eine schematische Darstellung von Aminosäuresubstitutionen und -insertionen in rekombinierten S-Layer-Proteinen.  
25

BEISPIELE:

30 1. Bakterienstämme, Medien und Plasmide

Gram-positive Bakterien des Stammes *Bacillus stearothermophilus* PV72 wurden bei 58°C in SVIII-Medium (Bartelmus und Perschak, Z.Zuckerind.7 (1957), 276-281) kultiviert. Bakterien des Stammes *E.coli* pop2135 (endA, thi, hsdR, malT, cI857, λpR, malPQ) wurden in LB-Medium kultiviert (Sambrook et al., (1989), supra). Zur Selektion von Transformanten wurde Ampi-

- 17 -

cillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml dem Medium zugegeben. Das Plasmid pPLcAT10 ( $\lambda$ pL, bla, colE1) (Stanssens et al., Gene 36 (1985), 211-223) wurde als Klonierungsvektor verwendet.

5

### 2. Manipulation von DNA-Fragmenten

Restriktionsanalyse von DNA, Agarosegelektrophorese und Klonierung von DNA-Fragmenten wurden nach den bei Sambrook et 10 al. (1989), supra, beschriebenen Standardmethoden durchgeführt.

Die Transformation von kompetenten Zellen erfolgte durch Elektroporation unter Verwendung eines Bio-Rad Genepulsers (Bio-15 Rad Laboratories, Richmond, Kalif., USA) nach Protokollen des Herstellers.

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513-1523) isoliert. Chromosomal 20 DNA wurde gemäß der bei Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology (1987), New York, John Wiley) beschriebenen Verfahren isoliert.

Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden von Boehringer Mannheim, New England Biolabs oder Stratagene bezogen 25 und gemäß den Vorschriften der Hersteller eingesetzt.

### 3. DNA-Sequenzierung

30 Die DNA-Sequenzen der 5'- und 3'-Regionen (einschließlich des für die Signalsequenz kodierenden Bereichs) des Gens sbsA im Vektor pPLcAT10 wurde nach der Dideoxykettenterminationsmethode von Sanger et al. bestimmt. Die zur Sequenzierung verwendeten Primer wurden auf Basis der bereits publizierten 35 sbsA-Sequenz (Kuen et al., Gene 145 (1994), 115-120) konstruiert.

- 18 -

#### 4. PCR-Amplifikation von sbsA

Die PCR-Amplifikation des sbsA-Gens erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 100 µl, in dem 200 µM Deoxynukleotide, 1U s Pfu-Polymerase (Stratagene), 1x Pfu-Reaktionspuffer, jeweils 0.5µM Oligonukleotidprimer und 100 ng genomischer DNA aus *B. stearothermophilus* als Matrize vorhanden waren. Die Amplifikation wurde über 30 Zyklen in einem Thermocycler (Biomed Thermocycler 60) durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus einem 10 Denaturierungsschritt von 1,5 min bei 95°C, einem Annealingsschritt von 1 min bei 56°C und 1 min bei 50°C sowie einem Extensionsschritt von 2 min bei 72°C.

Als Primer wurden der im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO.3 15 angegebene Primer T5-X, der den 5'-Bereich von sbsA flankiert und eine XbaI-Stelle enthält, sowie der im Sequenzprotokoll in SEQ ID NO.4 gezeigte Primer E verwendet, der die 20 Nukleotide stromabwärts gelegene Region des Transkriptionsterminators der sbsA-Sequenz flankiert und eine BamHI-Stelle enthält.

20 Die PCR-amplifizierten Produkte wurden auf einem 0.8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und zur Klonierung unter Verwendung des Systems von Gene Clean (BIO101 La Jolla, Kalif., USA) zur Klonierung gereinigt.

25

#### 5. Klonierung des sbsA-Gens in den Vektor pPLcAT10

Das durch PCR gewonnene sbsA-Gen mit einer Länge von 3,79 kb wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und 30 BamHI gespalten. Das resultierende XbaI-BamHI-Fragment wurde in die entsprechenden Restriktionsstellen des Vektors pPLcAT10 kloniert, so daß das sbsA-Gen unter transkriptioneller Kontrolle des stromaufwärts gelegenen pL-Promotors war. Das ATG-Startkodon der sbsA-Sequenz wurde durch die Klonierungsprozedur 35 rekonstruiert. Die klonierte sbsA-Sequenz enthielt die N-terminale Signalsequenz von sbsA und endete 20 nt nach dem Transkriptionsterminator. Nach Ligation der Vektor-DNA mit dem

- 19 -

sbsA-Fragment wurde der E.coli-Stamm pop2135 durch Elektro-transformation transformiert. Die resultierenden Klone wurden einer DNA-Restriktionsanalyse unterzogen. Ein positiver Klon wurde sequenziert, um die korrekten Sequenzübergänge an den 5' und 3'-Enden zu verifizieren. Dieser Klon wurde als pBK4 bezeichnet.

Eine schematische Darstellung des 3,79 kb XbaI sbsA-Fragments und seine Lokalisierung in der multiplen Klonierungsstelle des 10 Plasmids pBK4 ist in Fig.1 dargestellt (Abkürzungen: tT: Transkriptionsterminator; ori: Ursprung der DNA-Replikation; amp: Ampicillinresistenzgen).

#### 6. Rekombinante Expression des sbsA-Gens in E.coli

15

E.coli pop2135/pBK4-Zellen wurden bei 28°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,3 kultiviert. Dann wurde die Expression von sbsA durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 28°C auf 42°C induziert. 1,5 ml Aliquots wurden vor bzw. 20 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Induktion der sbsA-Expression entnommen. Als Kontrollen wurden E.coli pop2135/pPLcAT10 (kultiviert unter den gleichen Bedingungen) und B.stearothermophilus PV72 verwendet.

25 Kulturüberstände und Zellextrakte aus allen Proben wurden auf die Expression des S-Layer-Proteins durch SDS-PAGE und Western-Immunoblotting untersucht.

In Extrakten aus mit pBK4 transformierten E.coli-Zellen wurde 30 eine zusätzliche starke Proteinbande mit dem gleichen Molekulargewicht wie das Wildtyp-SbsA-Protein gefunden. Es wurden keine Abbauprodukte von SbsA selbst in einem Zeitraum bis zu 5 Stunden nach der Induktion der Expression gefunden. Dies läßt vermuten, daß das S-Layer-Protein sbsA in E.coli stabil ist 35 und nicht durch Proteasen abgebaut wird.

- 20 -

Es wurde eine densitometrische Bestimmung der relativen Menge an SbsA-Protein durchgeführt. Zu einem Zeitpunkt von 4 Stunden nach der Induktion lag das sbsA-Protein in einem Anteil von ca. 16% bezüglich des gesamten zellulären Proteins vor.

5

Das in E.coli erzeugte SbsA-Protein wanderte im SDS-Gel etwas langsamer als das natürliche SbsA-Protein aus B.stearothermophilus. Versuche zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des SbsA-Proteins durch Edman-Abbau schlugen aufgrund 10 einer Blockierung des N-Terminus fehl. Dies lässt vermuten, daß die Signalsequenz in E.coli nicht abgespalten wurde.

Auch eine Western Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen von E.coli/pBK4 ergab nur eine einzige sbsA- 15 spezifische Proteinbande mit einem etwas höheren Molekulargewicht als das Wildtyp-SbsA-Protein aus stearothermophilus.

Für den Western Blot wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen Antiserum 20 gegen SbsA aus Kaninchen inkubiert. Die Herstellung dieses Antiserums ist bei Egelseer et al. (J.Bacteriol.177 (1995), 1444-1451) beschrieben. Zum Nachweis gebundener SbsA-spezifischer Antikörper wurde ein Konjugat aus Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG und alkalischer Phosphatase verwendet.

25

Aus Überständen von mit pBK4 transformierten E.coli-Zellen konnte auch nach Induktion der sbsA-Gen-Expression kein SbsA-Protein nachgewiesen werden. Daraus ist ersichtlich, daß SbsA nicht in das umgebende Medium exportiert wird.

30

#### 7. Lokalisierung und Organisation des S-Layer-Proteins SbsA im Cytoplasma von E.coli

Zellen aus E.coli pop2135/pBK4, die aus Kulturen mit 1, 2, 3 35 und 5 Stunden nach Induktion der S-Layer-Proteinexpression geerntet wurden, wurden auf die intrazelluläre Organisation von sbsA untersucht. Nichtinduzierte, bei 28°C kultivierte

- 21 -

Zellen und Zellen von *B.stearothermophilus* PV72 wurden als Kontrollen untersucht.

Hierzu wurden gesamte Zellen beider Organismen fixiert und in 5 Spurrharz nach der Methode von Messner et al. (Int.J.Syst.Bacteriol.34 (1984), 202-210) fixiert und eingebettet. Anschließend wurden ultradünne Schnitte der eingebetteten Präparate hergestellt und mit Uranylacetat angefärbt.

- 10 Das Cytoplasma von nichtinduzierten *E.coli*-Zellen zeigte die typische granuläre Struktur, die sich auch bei einer Zunahme der OD der Suspensionen nicht änderte. Längsschnitte von *E.coli*-Zellen, die 1 Stunde nach Induktion der S-Layer-Protein-expression geerntet wurden, zeigten parallele, blattartige 15 Strukturen im Cytoplasma. Aus Querschnitten wurde ersichtlich, daß diese Strukturen eine konzentrische Anordnung zeigten.

Der Anteil blattartiger Strukturen zeigte einen deutlichen Anstieg zwischen 1 und 2 Stunden nach Induktion der sbsA-Expression und blieb danach im wesentlichen konstant.

Das in *E.coli* rekombinant hergestellte sbsA-Protein konnte auch durch Immunogoldmarkierung mit SbsA-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Auch mit dieser Nachweismethode 25 wurde eine geordnete Struktur des rekombinant hergestellten SbsA-Proteins gefunden.

Aus diesen morphologischen Daten war klar ersichtlich, daß das SbsA-Protein sich nicht zu unregelmäßigen Einschlußkörpern 30 aggregierte, sondern monomolekulare S-Layer-Kristalle bildete. Eine bemerkenswerte Eigenschaft der in *E.coli* assemblierten SbsA-S-Layer-Schichten war die konzentrische Anordnung in definierten Abständen. Das Vorhandensein der Signalsequenz störte die korrekte Assemblierung nicht.

8. Herstellung von rekombinanten sbsA-S-Layer-Genen

## 8.1 Insertion einer 6 bp langen DNA-Sequenz

5 Für die ortsspezifische Insertionsmutagenese des sbsA-Gens wurde eine modifizierte Kanamycinkassette (1,3 kb) verwendet, die durch Spaltung des Plasmids pWJC3 (erhalten von W.T. McAlister, New York) durch SmaI isoliert wurde. Die Kassette wurde in fünf verschiedene glattendige Restriktionsstellen des  
10 sbsA-Gens ligiert, nämlich in die NruI-Stelle an Position bp 582 (pSL582), in die SnaBI-Stelle an Position bp 917 (pSL917) und in jede der PvuII-Stellen an Position bp 878 (pSL878), bp 2504 (pSL2504) und bp 2649 (pSL2649). Nach Selektion von Kanamycin-resistenten Klonen wurde die Kassette aus der Inser-  
15 tionsstelle durch Spaltung mit ApaI, gefolgt von einer Religa-  
tion des S-Layer-Plasmids pBK4, entfernt. Durch die Heraus-  
schneide- und Religationsprozedur blieb eine Insertion von 6  
bp CCCGGG (ApaI Restriktionsstelle) zurück. Das System dieser  
Linkerinsertion ist schematisch in Fig.2 dargestellt.

20

Die resultierenden rekombinanten S-Layer-Gene kodieren für modifizierte, um 2 Aminosäuren verlängerte sbsA-Proteine.

Die konkreten Änderungen in der Primärstruktur der sbsA-Pro-  
25 teine sind in Fig.3 gezeigt. Im Klon pSL582 führte die Inser-  
tion zur Einfügung von Glycin und Prolin zwischen den Amino-  
säuren 194 und 195 am N-Terminus des SbsA-Proteins. Die Amino-  
säuren Alanin und Arginin wurden im Klon pSL917 zwischen die  
Aminosäuren 306 und 307 eingefügt. Im Klon pSL2649 wurde eine  
30 Insertion von Glycin und Prolin zwischen die Aminosäuren an  
den Positionen 883 und 884 eingefügt. Eine Insertion von Ala-  
nin und Prolin zwischen den Aminosäuren 293 und 294 wurde im  
Klon pSL878 erhalten. Weiterhin wurde das Alanin an Position  
293 durch Glycin ausgetauscht. Im Klon pSL2504 wurden die  
35 Aminosäuren Alanin und Prolin zwischen die Aminosäuren 835 und  
836 eingeführt und das Alanin an Position 835 durch Glycin  
ersetzt.

Alle durch Insertionsmutagenese erhaltenen Klone behielten ihre Fähigkeit zur Synthese des S-Layer-Proteins.

Um die Fähigkeit der modifizierten Proteine zur Assemblierung in S-Layer-Strukturen nachzuweisen, wurden gemäß der unter Punkt 7. beschriebenen Prozedur ultradünne Längsschnitte von gesamten Zellen, die 4h unter induktiven Bedingungen kultiviert worden waren, hergestellt. Es wurde gefunden, daß das Cytoplasma aller 5 Klone mit parallelen, blattartigen Strukturen gefüllt ist, welche der Krümmung der Zellpole folgen. Es gab keine morphologischen Unterschiede des Cytoplasma bei den 5 untersuchten verschiedenen Klonen. Es wurden genau die gleichen blattartigen Strukturen wie bei der Assemblierung des Wildtyp-SbsA-Protein in E.coli (Punkt 7.) festgestellt.

15

#### 8.2 Insertion einer für Streptavidin kodierenden DNA-Sequenz

Um zu untersuchen, ob auch die Insertion größerer Proteinsequenzen in das SbsA-Protein toleriert werden kann, wurde ein 20 mit ApaI-Linkern versehenes, für einen Teil von Streptavidin (160 Aminosäuren) kodierendes DNA-Fragment (SEQ ID No. 7) in die ApaI-Restriktionsstelle der in Beispiel Seite 1 hergestellten sbsA Klone pSL582, pSL878, pSL917 und pSL2649 Gen inseriert. Die Insertion der Streptavidinsequenz erfolgte bei 25 SL582 im Codon 197, bei pSL878 zwischen Codon 295 und 296, bei pSL917 zwischen Codon 308 und 309 und bei pSL2649 in Codon 886. Die Expression von SbsA-Streptavidin-Fusionsproteinen konnte bei allen Konstrukten durch SDS-Page und Immunoblots nachgewiesen werden. Durch EM-Analyse wurde festgestellt, daß 30 eine Selbstassemblierung der S-Layerstruktur bei den Fusionsproteinen mit Insertionen im Codon 197 und zwischen den Codons 295 und 296 möglich war.

Die SbsA-Streptavidin-Fusionsproteine können als Monomere isoliert und zu homogenen SbsA-Streptavidin S-Layern oder zu gemischten SbsA-Streptavidin/SbsA-S-Layern reassembliert werden. Sie können zur Bindung biotinylierter Substanzen sowie zur

- 24 -

Bestimmung der Bindekapazität von Enzymen und anderen gebundenen Molekülen eingesetzt werden.

### 8.3 Insertion einer für BetvI kodierenden DNA-Sequenz

5

Eine für den offenen Leserahmen von BetvI (161 Aminosäuren), das Hauptpollenallergen der Birke, kodierende DNA Sequenz (Ferreira et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 19574-19580) wurde an der ApaI-Stelle in den sbsA-Klon pSL878 inseriert. Es 10 konnte die Expression eines SbsA-BetvI-Fusionsproteins nachgewiesen werden, das eine immunologisch aktive BetvI-Domäne enthält.

Das resultierende Fusionsprotein kann für therapeutische oder 15 diagnostische Zwecke eingesetzt werden. So kann durch Verabreichung des Fusionsproteins versucht werden, eine T<sub>H</sub>2-gerichtete IgE-Antikörperreaktion in eine T<sub>H</sub>1-vermittelte Reaktion gegen BetvI umzuwandeln. Auf diese Weise kann das Auftreten 20 der Symptome einer Pollenallergie unterdrückt werden. Weiterhin können SbsA-BetvI Fusionsproteine zum Test von Anti-BetvI-Antikörperfekonzentrationen oder/und zur Verringerung hoher Konzentrationen an Anti-BetvI-IgE verwendet werden.

### 8.4. Insertion für ein Pseudorabies Virus Antigen kodierender 25 DNA-Sequenz

Es wurde eine Insertion der für das gB Epitop SmaBB (255 Aminosäuren) kodierenden DNA-Sequenz (Nucleotide 489-1224 entsprechend den Koordinaten gemäß EMBL-Seq: HEHSSGP2) von Pseudorabiesvirus in die SSpI-Stelle des sbsA-Gens nach nt 3484 30 (zwischen Codon 1161 und 1162) durchgeführt. Es konnte die Expression von SbsA-SmaBB Fusionsproteinen nachgewiesen werden.

Die Fusionsproteine können zum Testen gB-spezifischer Immunreaktionen verwendet werden. Eine Westernblot Analyse mit 35 einem monoklonalen Antikörper, welcher der inserierten Sequenz

- 25 -

entspricht, zeigte die immunologische Aktivität der viralen Domäne innerhalb der rekombinanten SbsA-SmaBB Proteine.

8.5 Insertion einer für PHB-Synthase (PhbC) von Alcaligenes  
5 eutrophus H16 kodierenden DNA-Sequenz

Eine regelmäßige Anordnung von Polypeptidstrukturen mit enzymatischer Aktivität an der Oberfläche von S-Layern ist ein wichtiges Ziel zur Herstellung immobilisierter Enzyme innerhalb einer lebenden Zelle und im Falle der 590 Aminosäuren langen PHB Synthase zur Herstellung einer molekularen Maschine für eine Biopolymersynthese.

Das phbC Gen wurde durch PCR aus dem Plasmid p4A (Janes et 15 al., Molecular characterisation of the poly- $\beta$ -hydroxy-butyrate biosynthesis in Alcaligenes eutrophus H16. In: Novel Biodegradable Microbial Polymers (HRSG. Daves, E. A.), pp 175-190 (1990), Kluver, Dordrecht) als 1770 nt langes DNA-Fragment (entsprechend einem offenen Leserahmen von 590 Aminosäuren) 20 isoliert und in die ApaI-Schnittstelle des sbsA-Klons pSL878 inseriert, wobei das Plasmid pSbsA-PhbC erhalten wurde. In einer mit diesem Plasmid transformierten E.coli Zelle konnte die Expression eines SbsA-PhbC-Fusionsproteins mit ca. 195 kD nachgewiesen werden. Bei Insertion von 2 Kopien des phbC-Gens 25 hintereinander in die ApaI-Stelle von pSL878 konnte die Expression eines Fusionsproteins mit ca. 260 kD nachgewiesen werden.

Für einen funktionellen Test der enzymatischen Aktivität des 30 SbsA-PhbC Konstrukts wurden die E.coli Zellen, die das Plasmid pSbsA-PhbC enthielten, mit dem Plasmid pUMS cotransformiert, welches die  $\beta$ -Ketothiolase (PhbA) und die Acetoacetyl-CoA-Reduktase (PhbB) von A. eutrophus (Kalousek et al., Genetic engineering of PHB-synthase from Alcaligenes eutrophus H16. 35 In: Proceedings of the International Symposium on Bacterial Polyhydroxy-alkanoates, pp 426-427 (1993), HRSG. Schlegel H. G., Steinbüchel A. Goltze Druck, Göttingen) enthält. Die Poly-

- 26 -

$\beta$ -hydroxybutyrat-Bildung in den cotransformierten E.coli Zellen konnte durch Anfärbung mit Sudanschwarz, Gaschromatographie und Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Diese Befunde zeigen, daß das SbsA-PhbC-Konstrukt enzymatisch aktiv ist und erfolgreiches Beispiel zur Immobilisierung von Enzymen auf intrazellulären S-Layer-Matrizen darstellt.

#### 8.6 Insertion einer für ein bakterielles Luciferasegen codierenden DNA-Sequenz

Ein monocistronisches LuxAB Gen mit einer Länge von 2.070 nt, welches aus den beiden Untereinheiten LuxB und LuxB der bakteriellen Luciferase aus *Vibrio harveyi* bestehendes Fusionsprotein LuxAB enthält, wurde aus dem Plasmid pT7-mut3 (Boylan et al., J. Biol. Chem. 264 (1989), 1915-1918) durch PCR isoliert und in die ApaI Stelle des in Beispiel 8.1 hergestellten Klons pSL878 inseriert, wobei das Plasmid pBK878-LuxAB erhalten wurde. In einer mit diesem Plasmid transformierten E.coli Zelle konnte die Expression eines SbsA-PhbC Fusionsproteins mit ca. 207 kD nachgewiesen werden. Die enzymatische Aktivität des Fusionsproteins wurde durch die bei Boylan et al., Supra, beschriebene Methode gezeigt.

#### 9. Isolierung und Charakterisierung des sbsB-Gens

- Als Grundlage für die Isolierung des sbsB-Gens diente die Aminosäuresequenz des N-Terminus sowie die Sequenz von drei internen Peptiden des SbsB-Proteins. Von diesen Peptidsequenzen ausgehend wurden degenerierte Oligonukleotidprimer konstruiert und für die PCR eingesetzt. Auf diese Weise wurde ein 1076 bp langes PCR-Fragment aus der chromosomal DNA von *B.stearothermophilus* amplifiziert, kloniert und sequenziert (entsprechend Position 100-1176 der in SEQ ID NO.5 gezeigten Sequenz).
- Für die Amplifikation der 5'- und 3'-seitigen Abschnitte des sbsB-Gens wurde die Methode der inversen PCR angewendet und

mit Hilfe verschiedener Primerkombinationen schrittweise überlappende DNA-Fragmente erhalten und sequenziert.

Zur Amplifizierung des vollständigen sbsB-Gens wurden als  
5 Primer der im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO.8 angegebene  
Primer NIS 2AG, der den 5'-Bereich von sbsB enthält, sowie der  
im Sequenzprotokoll in SEQ ID NO.9 angegebene Primer LIS C3  
verwendet, der den 3'-Bereich von sbsB enthält.

10 Das auf diese Weise erhaltene PCR-Fragment, welches die in SEQ  
ID NO.5 gezeigte Nukleotidsequenz mit 5'- und 3'-BamHI-Re-  
striktionsschnittstellen enthält, wurde wie im Beispiel 5 be-  
schrieben in den Vektor pPLcAT10 kloniert, in dem die Express-  
sion unter Kontrolle des Lambda PL-Promotors erfolgte.

15

Weiterhin wurde das sbsB-PCR-Fragment mit 5'seitiger EcoRI-  
und 3'seitiger BamHI-Schnittstelle in den Vektor pUC18 klo-  
niert, in dem die Expression unter Kontrolle des lac-Promotors  
erfolgte.

20

Der Nachweis der sbsB-Expression erfolgte wie in den Beispie-  
len 6 und 7 beschrieben durch SDS-Gelelektrophorese und Elek-  
tronenmikroskopie.

25 10. Herstellung von rekombinanten sbsB-S-Layer-Genen

Analog der in Beispiel 8 beschriebenen Methoden wurden rekombinante sbsB Gene hergestellt.

30 So wurde gemäß der in Beispiel 8.1 beschriebenen Methode eine  
6 nt lange, eine ApaI-Restriktionsschnittstelle enthaltende  
DNA-Sequenz an verschiedenen Positionen in das sbsB-Layer-Gen  
eingeführt. Auf diese Weise wurden die rekombinanten sbsB  
Klone pAK407, pAK481 und pAK1582 mit ApaI-Schnittstellen bei  
35 nt 407 (Codon 136), 481 (Codon 161/162) und 1582 (Codon  
528/529) erhalten. Diese durch Insertionsmutagene erhaltenen

- 28 -

Klone behielten ihre Fähigkeit zur Synthese des S-Layerproteins und zur Ausbildung von S-Layerstrukturen.

Analog der in Beispiel 8.2 beschriebenen Methode wurde ein für 5 Streptavidin kodierendes DNA-Fragment in die ApaI-Restrikitionsstellen der sbsB-Klone pAK407 bzw. pAK481 eingeführt.

Analog Beispiel 8.4 wurde eine für das gB-Epitop SmaBB codierende DNA-Sequenz in die ApaI-Schnittstellen der sbsB Klone 10 pAK481 und pAK1582 eingeführt. In den mit den resultierenden rekombinanten Plasmiden transformierten E.coli Zellen konnte die Expression von sbsB-SmaB Fusionsproteinen mit ca. 130 kD nachgewiesen werden. Bei Insertion von zwei Kopien des SmaBB Epitops hintereinander in die ApaI-Schnittstelle von pAK481 15 konnte die Expression eines Fusionproteins mit ca. 157 kD nachgewiesen werden. Die SmaBB Domänen der Fusionsproteine wurden von spezifischen Antikörpern erkannt.

Analog zu Beispiel 8.6 konnte bei Insertion der LuxAB Sequenz 20 in die ApaI-Schnittstelle von pAK407 die Expression eines 175 kD SbsB-LuxAB Fusionproteins nachgewiesen werden.

11. Heterologe Expression von sbsA und sbsB in Bacillus subtilis

25

Zur heterologen Expression von sbsA und sbsB in B. subtilis wurde der Integrationsvektor pX (Kim, L., Mogk, A. und Schumann W., Gene 181 (1996), 71-76: A xylose-inducible Bacillus subtilis integration vector and its application) verwendet. In 30 den resultierenden rekombinanten Expressionsvektoren befinden sich die S-Layer Gene unter der transkriptionellen Kontrolle des xyl Promotors. Transformanten von B. subtilis mit einem im Chromosom integrierten S-Layergen zeigten eine durch Zugabe von Xylose zum Wachstumsmedium induzierbare Expression von 35 großen Mengen an S-Layerproteinen im Überstand der Zellen. Dies zeigt, daß die Signalsequenzen von sbsA und sbsB von der B. subtilis Zelle erkannt werden.

- 29 -

Auf analoge Weise konnte eine heterologe Expression rekombinanter sbsA und sbsB Layergene in *B. subtilis* erreicht werden.

- 30 -

SEQUENZPROTOKOLL

s (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- 10 (A) NAME: Werner Lubitz  
(B) STRASSE: Schoenborngasse 12/7  
(C) ORT: Wien  
(E) LAND: Austria  
(F) POSTLEITZAHL: 1080

- 15 (A) NAME: Uwe Sleytr  
(B) STRASSE: Parhamerplatz 10  
(C) ORT: Wien  
(E) LAND: Austria  
(F) POSTLEITZAHL: 1170

20 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Expression  
von S-Layer-Proteinen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

25 (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
30 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30  
(EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3687 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: beides  
40 (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Bacillus stearothermophilus  
45 (B) STAMM: PV72

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): sbsA

50 (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE: 1..3684

- 31 -

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig\_peptide
- (B) LAGE:1..90

5

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide
- (B) LAGE:91..3684

10

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG GAT AGG AAA AAA GCT GTG AAA CTA GCA ACA GCA AGT GCT ATT GCA Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala	48
15 -30   -25   -20   -15	
GCA AGT GCA TTT GTC GCT GCA AAT CCA AAC GCT TCT GAA GCG GCT ACA Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr	96
20   -10   -5   1	
GAT GTA GCA ACA GTA GTA AGC CAA GCA AAA GCA CAG TTC AAA AAA GCA Asp Val Ala Thr Val Val Ser Gln Ala Lys Ala Gln Phe Lys Lys Ala	144
25   5   10   15	
TAC TAT ACT TAC AGC CAT ACA GTA ACG GAA ACT GGT GAA TTC CCA AAC Tyr Tyr Thr Tyr Ser His Thr Val Thr Glu Thr Gly Glu Phe Pro Asn	192
30   20   25   30	
ATT AAC GAT GTA TAT GCT GAA TAC AAC AAA GCG AAA AAA CGA TAC CGT Ile Asn Asp Val Tyr Ala Glu Tyr Asn Lys Ala Lys Lys Arg Tyr Arg	240
35   35   40   45   50	
GAT GCG GTA GCA TTA GTG AAT AAA GCA GGT GGC GCG AAA AAA GAC GCT Asp Ala Val Ala Leu Val Asn Lys Ala Gly Gly Ala Lys Lys Asp Ala	288
40   55   60   65	
TAC TTA GCT GAT TTA CAA AAA GAA TAT GAA ACT TAC GTT TTC AAA GCA Tyr Leu Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Thr Tyr Val Phe Lys Ala	336
45   70   75   80	
AAC CCT AAA TCT GGC GAA GCT CGT GTA GCA ACT TAC ATC GAT GCT TAC Asn Pro Lys Ser Gly Glu Ala Arg Val Ala Thr Tyr Ile Asp Ala Tyr	384
50   85   90   95	
AAC TAT GCA ACA AAA TTA GAC GAA ATG CGC CAA GAG CTA GAG GCT GCT Asn Tyr Ala Thr Lys Leu Asp Glu Met Arg Gln Glu Leu Glu Ala Ala	432
55   100   105   110	
GTT CAA GCA AAA GAT TTA GAA AAA GCA GAA CAA TAC TAT CAC AAA ATT Val Gln Ala Lys Asp Leu Glu Lys Ala Glu Gln Tyr Tyr His Lys Ile	480
60   115   120   125   130	
CCT TAT GAA ATT AAA ACT CGC ACA GTC ATT TTA GAT CGC GTA TAT GGT Pro Tyr Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ile Leu Asp Arg Val Tyr Gly	528
65   135   140   145	
AAA ACA ACT CGT GAT TTA CTT CGC TCT ACA TTT AAA GCA AAA GCA CAA Lys Thr Thr Arg Asp Leu Leu Arg Ser Thr Phe Lys Ala Lys Ala Gln	576
70   150   155   160	
GAA CTT CGC GAC AGC TTA ATT TAT GAT ATT ACC GTC GCA ATG AAA GCG Glu Leu Arg Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Ile Thr Val Ala Met Lys Ala	624
75   165   170   175	

- 32 -

CGC GAA GTA CAA GAC GCT GTG AAA GCA GGC AAT TTA GAC AAA GCT AAA Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Asn Leu Asp Lys Ala Lys 180 185 190	672
5 GCT GCT GTT GAT CAA ATC AAT CAA TAC TTA CCA AAA GTA ACA GAT GCT Ala Ala Val Asp Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Pro Lys Val Thr Asp Ala 195 200 205 210	720
10 TTC AAA ACT GAA CTA ACA GAA GTA GCG AAA AAA GCA TTA GAT GCA GAT Phe Lys Thr Glu Leu Thr Glu Val Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Asp 215 220 225	768
15 GAA GCT GCG CTT ACT CCA AAA GTT GAA AGT GTA AGT GCG ATT AAC ACT Glu Ala Ala Leu Thr Pro Lys Val Glu Ser Val Ser Ala Ile Asn Thr 230 235 240	816
20 CAA AAC AAA GCT GTT GAA TTA ACA GCA GTA CCA GTG AAC GGA ACA CTA Gln Asn Lys Ala Val Glu Leu Thr Ala Val Pro Val Asn Gly Thr Leu 245 250 255	864
25 AAA TTA CAA CTT TCA GCT GCA AAT GAA GAT ACA GTA AAC GTA AAT Lys Leu Gln Leu Ser Ala Ala Asn Glu Asp Thr Val Asn Val Asn 260 265 270	912
30 30 ACT GTA CGT ATC TAT AAA GTG GAC GGT AAC ATT CCA TTT GCC CTT AAT Thr Val Arg Ile Tyr Lys Val Asp Gly Asn Ile Pro Phe Ala Leu Asn 275 280 285 290	960
35 35 ACG GCA GAT GTT TCT TTA TCT ACA GAC GGA AAA ACT ATC ACT GTG GAT Thr Ala Asp Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Lys Thr Ile Thr Val Asp 295 300 305	1008
40 40 GCT TCA ACT CCA TTC GAA AAT AAT ACG GAG TAT AAA GTA GTA GTT AAA Ala Ser Thr Pro Phe Glu Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Val Val Val Lys 310 315 320	1056
45 45 GGT ATT AAA GAC AAA AAT GGC AAA GAA TTT AAA GAA GAT GCA TTC ACT Gly Ile Lys Asp Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Glu Asp Ala Phe Thr 325 330 335	1104
50 50 TTC AAG CTT CGA AAT GAT GCT GTA GTT ACT CAA GTG TTT GGA ACT AAT Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn 340 345 350	1152
55 55 GTA ACA AAC AAC ACT TCT GTA AAC TTA GCA GCA GGT ACT TTC GAC ACT Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr 355 360 365 370	1200
60 60 GAC GAT ACT TTA ACA GTA GTA TTT GAT AAG TTG TTA GCA CCT GAA ACT Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr 375 380 385	1248
65 65 GTA AAC AGC TCG AAC GTT ACT ATT ACA GAT GTT GAA ACT GGA AAA CGC Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg 390 395 400	1296
70 70 ATT CCA GTA ATT GCA TCT ACT TCT GGT TCT ACA ATT ACT ATT ACG TTA Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu 405 410 415	1344
75 75 AAA GAA GCG TTA GTA ACT GGT AAA CAA TAT AAA CTT GCT ATC AAT AAT Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn 420 425 430	1392
80 80 80 GTT AAA ACA TTA ACT GGT TAC AAT GCA GAA GCT TAC GAG TTA GTG TTC Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe 435 440 445 450	1440

- 33 -

	ACT GCA AAC GCA TCA GCA CCA ACT GTT GCT ACC GCT CCT ACT ACT TTA Thr Ala Asn Ala Ser Ala Pro Thr Val Ala Thr Ala Pro Thr Thr Leu 455	460	465	1488	
5	GGT GGT ACA ACT TTA TCT ACT GGT TCT CTT ACA ACA AAT GTT TGG GGT Gly Gly Thr Thr Leu Ser Thr Gly Ser Leu Thr Thr Asn Val Trp Gly 470	475	480	1536	
10	AAA TTG GCT GGT GTG AAT GAA GCT GGA ACT TAT TAT CCT GGT CTT Lys Leu Ala Gly Gly Val Asn Glu Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Gly Leu 485	490	495	1584	
15	CAA TTC ACA ACA ACG TTT GCT ACT AAG TTA GAC GAA TCT ACT TTA GCT Gln Phe Thr Thr Phe Ala Thr Lys Leu Asp Glu Ser Thr Leu Ala 500	505	510	1632	
20	GAT AAC TTT GTA TTA GTT GAA AAA GAA TCT GGT ACA GTT GTT GCT TCT Asp Asn Phe Val Leu Val Glu Ser Gly Thr Val Val Ala Ser 515	520	525	530	1680
25	GAA CTA AAA TAT AAT GCA GAC GCT AAA ATG GTA ACT TTA GTG CCA AAA Glu Leu Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Lys Met Val Thr Leu Val Pro Lys 535	540	545	1728	
30	GCG GAC CTT AAA GAA AAT ACA ATC TAT CAA ATC AAA ATT AAA AAA GGC Ala Asp Leu Lys Glu Asn Thr Ile Tyr Gln Ile Lys Ile Lys Lys Gly 550	555	560	1776	
35	TTG AAG TCC GAT AAA GGT ATT GAA TTA GGC ACT GTT AAC GAG AAA ACA Leu Lys Ser Asp Lys Gly Ile Glu Leu Gly Thr Val Asn Glu Lys Thr 565	570	575	1824	
40	TAT GAG TTC AAA ACT CAA GAC TTA ACT GCT CCT ACA GTT ATT AGC GTA Tyr Glu Phe Lys Thr Gln Asp Leu Thr Ala Pro Thr Val Ile Ser Val 580	585	590	1872	
45	ACG TCT AAA AAT GGC GAC GCT GGA TTA AAA GTA ACT GAA GCT CAA GAA Thr Ser Lys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Lys Val Thr Glu Ala Gln Glu 595	600	605	610	1920
50	TTT ACT GTG AAG TTC TCA GAG AAT TTA AAT ACA TTT AAT GCT ACA ACC Phe Thr Val Lys Phe Ser Glu Asn Leu Asn Thr Phe Asn Ala Thr Thr 615	620	625	1968	
55	GTT TCG GGT AGC ACA ATC ACA TAC GGT CAA GTT GCT GTA GTA AAA GCG Val Ser Gly Ser Thr Ile Thr Tyr Gly Gln Val Ala Val Val Lys Ala 630	635	640	2016	
60	GGT GCA AAC TTA TCT GCT CTT ACA GCA AGT GAC ATC ATT CCA GCT AGT Gly Ala Asn Leu Ser Ala Leu Thr Ala Ser Asp Ile Ile Pro Ala Ser 645	650	655	2064	
65	GTT GAA GCG GTT ACT GGT CAA GAT GGA ACA TAC AAA GTG AAA GTT GCT Val Glu Ala Val Thr Gly Gln Asp Gly Thr Tyr Lys Val Lys Val Ala 660	665	670	2112	
70	GCT AAC CAA TTA GAA CGT AAC CAA GGG TAC AAA TTA GTA GTG TTC GGT Ala Asn Gln Leu Glu Arg Asn Gln Gly Tyr Lys Leu Val Val Phe Gly 675	680	685	690	2160
75	AAA GGT GCA ACA GCT CCT GTT AAA GAT GCT GCA AAT GCA AAT ACT TTA Lys Gly Ala Thr Ala Pro Val Lys Asp Ala Ala Asn Ala Asn Thr Leu 695	700	705	2208	
80	GCA ACT AAC TAT ATC TAT ACA TTT ACA ACT GAA GGT CAA GAC GTA ACA Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Thr Phe Thr Glu Gly Gln Asp Val Thr 710	715	720	2256	

- 34 -

GCA CCA ACG GTT ACA AAA GTA TTC AAA GGT GAT TCT TTA AAA GAC GCT Ala Pro Thr Val Thr Lys Val Phe Lys Gly Asp Ser Leu Lys Asp Ala 725	730	735	2304
5 GAT GCA GTT ACT ACA CTT ACG AAC GTT GAT GCA GGT CAA AAA TTC ACT Asp Ala Val Thr Thr Leu Thr Asn Val Asp Ala Gly Gln Lys Phe Thr 740	745	750	2352
ATC CAA TTT AGC GAA GAA TTA AAA ACT TCT AGT GGT TCT TTA GTG GGT 10 Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly 755	760	765	2400
GGC AAA GTA ACT GTC GAG AAA TTA ACA AAC AAC GGA TGG GTA GAT GCT Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala 15	775	780	2448
GGT ACT GGA ACA ACT GTA TCA GTT GCT CCT AAG ACA GAT GCA AAT GGT Gly Thr Gly Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly 20	790	795	2496
AAA GTA ACA GCT GCT GTG GTT ACA TTA ACT GGT CTT GAC AAT AAC GAC Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp 25	805	810	2544
AAA GAT GCG AAA TTG CGT CTG GTA GTA GAT AAG TCT TCT ACT GAT GGA Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Val Val Asp Lys Ser Ser Thr Asp Gly 30	820	825	2592
ATT GCT GAT GTA GCT GGT AAT GTA ATT AAG GAA AAA GAT ATT TTA ATT 35 Ile Ala Asp Val Ala Gly Asn Val Ile Lys Glu Lys Asp Ile Leu Ile 835	840	845	2640
CGT TAC AAC AGC TGG AGA CAC ACT GTA GCT TCT GTG AAA GCT GCT GCT Arg Tyr Asn Ser Trp Arg His Thr Val Ala Ser Val Lys Ala Ala Ala 35	855	860	2688
GAC AAA GAT GGT CAA AAC GCT TCT GCT GCA TTC CCA ACA AGC ACT GCA Asp Lys Asp Gly Gln Asn Ala Ser Ala Ala Phe Pro Thr Ser Thr Ala 40	870	875	2736
ATT GAT ACA ACT AAG AGC TTA TTA GTT GAA TTC AAT GAA ACT GAT TTA Ile Asp Thr Thr Lys Ser Leu Leu Val Glu Phe Asn Glu Thr Asp Leu 45	885	890	2784
GCG GAA GTT AAA CCT GAG AAC ATC GTT GTT AAA GAT GCA GCA GGT AAT Ala Glu Val Lys Pro Glu Asn Ile Val Val Lys Asp Ala Ala Gly Asn 50	900	905	2832
GCG GTA GCT GGT ACT GTA ACA GCA TTA GAC GGT TCT ACA AAT AAA TTT Ala Val Ala Gly Thr Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Thr Asn Lys Phe 55	915	920	2880
GTA TTC ACT CCA TCT CAA GAA TTA AAA GCT GGT ACA GTT TAC TCT GTA Val Phe Thr Pro Ser Gln Glu Leu Lys Ala Gly Thr Val Tyr Ser Val 55	935	940	2928
ACA ATT GAC GGT GTG AGA GAT AAA GTA GGT AAC ACA ATC TCT AAA TAC Thr Ile Asp Gly Val Arg Asp Lys Val Gly Asn Thr Ile Ser Lys Tyr 60	950	955	2976
ATT ACT TCG TTC AAG ACT GTA TCT GCG AAT CCA ACG TTA TCT TCA ATC Ile Thr Ser Phe Lys Thr Val Ser Ala Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile 65	965	970	3024
AGC ATT GCT GAC GGT GCA GTT AAC GTT GAC CGT TCT AAA ACA ATT ACA Ser Ile Ala Asp Gly Ala Val Asn Val Asp Arg Ser Lys Thr Ile Thr 65	980	985	3072

- 35 -

ATT GAA TTC AGC GAT TCA GTT CCA AAC CCA ACA ATC ACT CTT AAG AAG Ile Glu Phe Ser Asp Ser Val Pro Asn Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys 995 1000 1005 1010	3120
5 GCT GAC GGA ACT TCA TTT ACT AAT TAC ACT TTA GTA AAT GTA AAT AAT Ala Asp Gly Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Thr Leu Val Asn Val Asn Asn 1015 1020 1025	3168
10 GAA AAT AAA ACA TAC AAA ATT GTA TTC CAC AAA GGT GTA ACA CTT GAC Glu Asn Lys Thr Tyr Lys Ile Val Phe His Lys Gly Val Thr Leu Asp 1030 1035 1040	3216
15 GAG TTT ACT CAA TAT GAG TTA GCA GTT TCA AAA GAT TTT CAA ACT GGT Glu Phe Thr Gln Tyr Glu Leu Ala Val Ser Lys Asp Phe Gln Thr Gly 1045 1050 1055	3264
20 ACT GAT ATT GAT AGC AAA GTT ACA TTC ATC ACA GGT TCT GTT GCT ACT Thr Asp Ile Asp Ser Lys Val Thr Phe Ile Thr Gly Ser Val Ala Thr 1060 1065 1070	3312
25 GAC GAA GTA AAA CCT GCT CTA GTA GGC GTT GGT TCA TGG AAT GGA ACA Asp Glu Val Lys Pro Ala Leu Val Gly Val Gly Ser Trp Asn Gly Thr 1075 1080 1085 1090	3360
30 AGC TAT ACT CAG GAT GCT GCA GCA ACA CGA CTT CGG TCT GTA GCT GAC Ser Tyr Thr Gln Asp Ala Ala Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Asp 1095 1100 1105	3408
35 TTC GTT GCG GAG CCA GTT GCC CTT CAA TTC TCA GAA GGT ATC GAT TTA Phe Val Ala Glu Pro Val Ala Leu Gln Phe Ser Glu Gly Ile Asp Leu 1110 1115 1120	3456
40 ACG AAT GCA ACT GTG ACA GTA ACA AAT ATT ACT GAT GAT AAA ACT GTT Thr Asn Ala Thr Val Thr Val Thr Asn Ile Thr Asp Asp Lys Thr Val 1125 1130 1135	3504
45 GAA GTT ATT TCA AAA GAG AGT GTA GAC GCA GAC CAT GAT GCA GGT GCT Glu Val Ile Ser Lys Glu Ser Val Asp Ala Asp His Asp Ala Gly Ala 1140 1145 1150	3552
50 ACT AAG GAG ACA TTA GTA ATT AAC ACA GTT ACT CCT TTA GTA CTT GAT Thr Lys Glu Thr Leu Val Ile Asn Thr Val Thr Pro Leu Val Leu Asp 1155 1160 1165 1170	3600
55 AAC AGC AAG ACT TAT AAG ATT GTT GTA AGT GGA GTT AAA GAT GCA GCA Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Ile Val Val Ser Gly Val Lys Asp Ala Ala 1175 1180 1185	3648
60 GGT AAT GTT GCA GAT ACT ATT ACA TTC TAT ATT AAG TAA Gly Asn Val Ala Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Ile Lys 1190 1195	3687

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

55

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 1228 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

60

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

- 36 -

Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala  
 -30 -25 -20 -15

5 Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr  
 -10 -5 1

Asp Val Ala Thr Val Val Ser Gln Ala Lys Ala Gln Phe Lys Lys Ala  
 5 10 15

10 Tyr Tyr Thr Tyr Ser His Thr Val Thr Glu Thr Gly Glu Phe Pro Asn  
 20 25 30

15 Ile Asn Asp Val Tyr Ala Glu Tyr Asn Lys Ala Lys Lys Arg Tyr Arg  
 35 40 45 50

Asp Ala Val Ala Leu Val Asn Lys Ala Gly Gly Ala Lys Lys Asp Ala  
 55 60 65

20 Tyr Leu Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Thr Tyr Val Phe Lys Ala  
 70 75 80

Asn Pro Lys Ser Gly Glu Ala Arg Val Ala Thr Tyr Ile Asp Ala Tyr  
 85 90 95

25 Asn Tyr Ala Thr Lys Leu Asp Glu Met Arg Gln Glu Leu Glu Ala Ala  
 100 105 110

30 Val Gln Ala Lys Asp Leu Glu Lys Ala Glu Gln Tyr Tyr His Lys Ile  
 115 120 125 130

Pro Tyr Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ile Leu Asp Arg Val Tyr Gly  
 135 140 145

35 Lys Thr Thr Arg Asp Leu Leu Arg Ser Thr Phe Lys Ala Lys Ala Gln  
 150 155 160

Glu Leu Arg Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Ile Thr Val Ala Met Lys Ala  
 165 170 175

40 Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Asn Leu Asp Lys Ala Lys  
 180 185 190

45 Ala Ala Val Asp Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Pro Lys Val Thr Asp Ala  
 195 200 205 210

Phe Lys Thr Glu Leu Thr Glu Val Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Asp  
 215 220 225

50 Glu Ala Ala Leu Thr Pro Lys Val Glu Ser Val Ser Ala Ile Asn Thr  
 230 235 240

Gln Asn Lys Ala Val Glu Leu Thr Ala Val Pro Val Asn Gly Thr Leu  
 245 250 255

55 Lys Leu Gln Leu Ser Ala Ala Asn Glu Asp Thr Val Asn Val Asn  
 260 265 270

Thr Val Arg Ile Tyr Lys Val Asp Gly Asn Ile Pro Phe Ala Leu Asn  
 275 280 285 290

Thr Ala Asp Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Lys Thr Ile Thr Val Asp  
 295 300 305

65 Ala Ser Thr Pro Phe Glu Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Val Val Val Lys  
 310 315 320

- 37 -

Gly Ile Lys Asp Lys Asn Gly	325	Lys Glu Phe Lys Glu Asp Ala Phe Thr	330	335
Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn	340	345	350	
Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr	355	360	365	370
10 Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr	375	380	385	
Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg	390	395	400	
15 Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu	405	410	415	
Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn	420	425	430	
20 Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe	435	440	445	450
25 Thr Ala Asn Ala Ser Ala Pro Thr Val Ala Thr Ala Pro Thr Thr Leu	455	460	465	
Gly Gly Thr Thr Leu Ser Thr Gly Ser Leu Thr Thr Asn Val Trp Gly	470	475	480	
30 Lys Leu Ala Gly Gly Val Asn Glu Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Gly Leu	485	490	495	
Gln Phe Thr Thr Phe Ala Thr Lys Leu Asp Glu Ser Thr Leu Ala	500	505	510	
35 Asp Asn Phe Val Leu Val Glu Lys Glu Ser Gly Thr Val Val Ala Ser	515	520	525	530
40 Glu Leu Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Lys Met Val Thr Leu Val Pro Lys	535	540	545	
Ala Asp Leu Lys Glu Asn Thr Ile Tyr Gln Ile Lys Ile Lys Lys Gly	550	555	560	
45 Leu Lys Ser Asp Lys Gly Ile Glu Leu Gly Thr Val Asn Glu Lys Thr	565	570	575	
Tyr Glu Phe Lys Thr Gln Asp Leu Thr Ala Pro Thr Val Ile Ser Val	580	585	590	
50 Thr Ser Lys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Lys Val Thr Glu Ala Gln Glu	595	600	605	610
55 Phe Thr Val Lys Phe Ser Glu Asn Leu Asn Thr Phe Asn Ala Thr Thr	615	620	625	
Val Ser Gly Ser Thr Ile Thr Tyr Gly Gln Val Ala Val Val Lys Ala	630	635	640	
60 Gly Ala Asn Leu Ser Ala Leu Thr Ala Ser Asp Ile Ile Pro Ala Ser	645	650	655	
65 Val Glu Ala Val Thr Gly Gln Asp Gly Thr Tyr Lys Val Lys Val Ala	660	665	670	

- 38 -

Ala Asn Gln Leu Glu Arg Asn Gln Gly Tyr Lys Leu Val Val Phe Gly			
675	680	685	690
Lys Gly Ala Thr Ala Pro Val Lys Asp Ala Ala Asn Ala Asn Thr Leu			
5	695	700	705
Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Thr Phe Thr Thr Glu Gly Gln Asp Val Thr			
710	715	720	
10 Ala Pro Thr Val Thr Lys Val Phe Lys Gly Asp Ser Leu Lys Asp Ala			
725	730	735	
Asp Ala Val Thr Thr Leu Thr Asn Val Asp Ala Gly Gln Lys Phe Thr			
15 740	745	750	
Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly			
755	760	765	770
Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala			
20 775	780	785	
Gly Thr Gly Thr Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly			
790	795	800	
25 Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp			
805	810	815	
Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Val Val Asp Lys Ser Ser Thr Asp Gly			
30 820	825	830	
Ile Ala Asp Val Ala Gly Asn Val Ile Lys Glu Lys Asp Ile Leu Ile			
835	840	845	850
Arg Tyr Asn Ser Trp Arg His Thr Val Ala Ser Val Lys Ala Ala Ala			
35 855	860	865	
Asp Lys Asp Gly Gln Asn Ala Ser Ala Ala Phe Pro Thr Ser Thr Ala			
870	875	880	
40 Ile Asp Thr Thr Lys Ser Leu Leu Val Glu Phe Asn Glu Thr Asp Leu			
885	890	895	
Ala Glu Val Lys Pro Glu Asn Ile Val Val Lys Asp Ala Ala Gly Asn			
900	905	910	
45 Ala Val Ala Gly Thr Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Thr Asn Lys Phe			
915	920	925	930
Val Phe Thr Pro Ser Gln Glu Leu Lys Ala Gly Thr Val Tyr Ser Val			
50 935	940	945	
Thr Ile Asp Gly Val Arg Asp Lys Val Gly Asn Thr Ile Ser Lys Tyr			
950	955	960	
55 Ile Thr Ser Phe Lys Thr Val Ser Ala Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile			
965	970	975	
Ser Ile Ala Asp Gly Ala Val Asn Val Asp Arg Ser Lys Thr Ile Thr			
60 980	985	990	
Ile Glu Phe Ser Asp Ser Val Pro Asn Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys			
995	1000	1005	1010
65 Ala Asp Gly Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Thr Leu Val Asn Val Asn Asn			
1015	1020	1025	

- 39 -

Glu Asn Lys Thr Tyr Lys Ile Val Phe His Lys Gly Val Thr Leu Asp  
 1030 1035 1040  
 Glu Phe Thr Gln Tyr Glu Leu Ala Val Ser Lys Asp Phe Gln Thr Gly  
 5 1045 1050 1055  
 Thr Asp Ile Asp Ser Lys Val Thr Phe Ile Thr Gly Ser Val Ala Thr  
 1060 1065 1070  
 10 Asp Glu Val Lys Pro Ala Leu Val Gly Val Gly Ser Trp Asn Gly Thr  
 1075 1080 1085 1090  
 Ser Tyr Thr Gln Asp Ala Ala Ala Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Asp  
 1095 1100 1105  
 15 Phe Val Ala Glu Pro Val Ala Leu Gln Phe Ser Glu Gly Ile Asp Leu  
 1110 1115 1120  
 Thr Asn Ala Thr Val Thr Val Thr Asn Ile Thr Asp Asp Lys Thr Val  
 20 1125 1130 1135  
 Glu Val Ile Ser Lys Glu Ser Val Asp Ala Asp His Asp Ala Gly Ala  
 1140 1145 1150  
 25 Thr Lys Glu Thr Leu Val Ile Asn Thr Val Thr Pro Leu Val Leu Asp  
 1155 1160 1165 1170  
 Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Ile Val Val Ser Gly Val Lys Asp Ala Ala  
 1175 1180 1185  
 30 Gly Asn Val Ala Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Ile Lys  
 1190 1195

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

35

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - 40 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

45 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TTAACGATT CTAGATGGAT AGGAAAAAAG CTG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

50

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - 55 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

60 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

- 40 -

ATACCCGGGG GTACGGATCC GATAACAGATT TGAGCAA

37

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

5

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2766 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- 10 (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- 15 (A) ORGANISMUS: *Bacillus stearothermophilus*  
 (B) STAMM: PV72

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- 20 (B) CLON(E): sbsB

## (ix) MERKMALE:

- 25 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
 (B) LAGE: 1..2763

## (ix) MERKMALE:

- 30 (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig\_peptide  
 (B) LAGE: 1..93

## (ix) MERKMALE:

- 35 (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide  
 (B) LAGE: 94..2763

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

40	ATG GCT TAT CAA CCT AAG TCT TTT CGC AAG TTT GTT GCG ACA ACT GCA Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala -31 -30 -29 -28 -27 -26 -25 -24 -23 -22 -21 -20	48
45	ACA GCT GCC ATT GTA GCA TCT GCG GTA GCT CCT GTA GTA TCT GCA GCA Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1	96
50	AGC TTC ACA GAT GTT GCG CCG CAA TAT AAA GAT GCG ATC GAT TTC TTA Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu 5 10 15	144
55	GTA TCA ACT GGT GCA ACA AAA GGT AAA ACA GAA ACA AAA TTC GGC GTT Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val 20 25 30	192
60	TAC GAT GAA ATC ACT CGT CTA GAT GCG GCA GTT ATT CTT GCA AGA GTA Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val 35 40 45	240

- 41 -

TTA AAA CTA GAC GTT GAC AAC GCA AAA GAC GCA GGC TTC ACA GAT GTG Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val 50 55 60 65	288
5 CCA AAA GAC CGT GCA AAA TAC GTC AAC GCG CTT GTA GAA GCT GGC GTA Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val 70 75 80	336
10 TTA AAC CGT AAA GCA CCT GGC AAA TTT GGT GCA TAC GAC CCA TTA ACT Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr 85 90 95	384
15 CGC GTT GAA ATG GCA AAA ATC ATC GCG AAC CGT TAC AAA TTA AAA GCT Arg Val Glu Met Ala Lys Ile Ile Ala Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Ala 100 105 110	432
20 GAC GAT GTA AAA CTT CCA TTC ACT GAT GTA AAC GAT ACA TGG GCA CCA Asp Asp Val Lys Leu Pro Phe Thr Asp Val Asn Asp Thr Trp Ala Pro 115 120 125	480
25 TAC GTA AAA GCG CTT TAT AAA TAC GAA GTA ACC AAA AGG TTA AAA CAC Tyr Val Lys Ala Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Leu Lys His 130 135 140 145	528
30 CAA CAA GCT TCG GTG CAT ACC AAA AAC ATC ACT CTG CGT GAC TTT GCG Gln Gln Ala Ser Val His Thr Lys Asn Ile Thr Leu Arg Asp Phe Ala 150 155 160	576
35 CAA TTT GTA TAT AGA GCG GTG AAT ATT AAT GCA GTG CCA GAA ATA GTT Gln Phe Val Tyr Arg Ala Val Asn Ile Asn Ala Val Pro Glu Ile Val 165 170 175	624
40 GAA GTA ACT GCG GTT AAT TCG ACT ACA GTG AAA GTA ACA TTC AAT ACG Glu Val Thr Ala Val Asn Ser Thr Thr Val Lys Val Thr Phe Asn Thr 180 185 190	672
45 CAA ATT GCT GAT GTT GAT TTC ACA AAT TTT GCT ATC GAT AAC GGT TTA Gln Ile Ala Asp Val Asp Phe Thr Asn Phe Ala Ile Asp Asn Gly Leu 195 200 205	720
50 ACT GTT ACT AAA GCA ACT CTT TCT CGT GAT AAA AAA TCC GTA GAG GTT Thr Val Thr Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Lys Lys Ser Val Glu Val 210 215 220 225	768
55 GTG GTA AAT AAA CCG TTT ACT CGT AAT CAG GAA TAT ACA ATT ACA GCG Val Val Asn Lys Pro Phe Thr Arg Asn Gln Glu Tyr Thr Ile Thr Ala 230 235 240	816
60 ACA GGC ATT AAA AAT TTA AAA GGC GAG ACC GCT AAG GAA TTA ACT GGT Thr Gly Ile Lys Asn Leu Lys Gly Glu Thr Ala Lys Glu Leu Thr Gly 245 250 255	864
65 AAG TTT GTT TGG TCT GTT CAA GAT GCG GTA ACT GTT GCA CTA AAT AAT Lys Phe Val Trp Ser Val Gln Asp Ala Val Thr Val Ala Leu Asn Asn 260 265 270	912
70 AGT TCG CTT AAA GTT GGA GAG GAA TCT GGT TTA ACT GTA AAA GAT CAG Ser Ser Leu Lys Val Gly Glu Glu Ser Gly Leu Thr Val Lys Asp Gln 275 280 285	960
75 GAT GGC AAA GAT GTT GTA GGT GCT AAA GTA GAA CTT ACT TCT TCT AAT Asp Gly Lys Asp Val Val Gly Ala Lys Val Glu Leu Thr Ser Ser Asn 290 295 300 305	1008
80 ACT AAT ATT GTT GTA GTT TCA AGT GGC GAA GTA TCA GTC TCT GCT GCT Thr Asn Ile Val Val Val Ser Ser Gly Glu Val Ser Val Ser Ala Ala 310 315 320	1056

- 42 -

AAA GTT ACA GCT GTA AAA CCG GGA ACA GCT GAT GTT ACT GCA AAA GTT Lys Val Thr Ala Val Lys Pro Gly Thr Ala Asp Val Thr Ala Lys Val 325 330 335	1104
5 ACA TTA CCA GAT GGT GTT GTA CTA ACA AAT ACA TTT AAA GTG ACA GTT Thr Leu Pro Asp Gly Val Val Leu Thr Asn Thr Phe Lys Val Thr Val 340 345 350	1152
10 ACA GAA GTG CCT GTT CAA GTC CAA AAT CAA GGA TTT ACT TTA GTT GAT Thr Glu Val Pro Val Gln Val Gln Asn Gln Gly Phe Thr Leu Val Asp 355 360 365	1200
15 AAT CTT TCT AAT GCT CCA CAG AAT ACA GTT GCA TTT AAC AAA GCT GAG Asn Leu Ser Asn Ala Pro Gln Asn Thr Val Ala Phe Asn Lys Ala Glu 370 375 380 385	1248
20 AAA GTA ACT TCA ATG TTT GCT GGA GAA ACT AAA ACA GTT GCA ATG TAT Lys Val Thr Ser Met Phe Ala Gly Glu Thr Lys Thr Val Ala Met Tyr 390 395 400	1296
25 GAT ACT AAA AAC GGT GAT CCT GAA ACT AAA CCT GTT GAT TTC AAA GAT Asp Thr Lys Asn Gly Asp Pro Glu Thr Lys Pro Val Asp Phe Lys Asp 405 410 415	1344
30 GCA ACT GTA CGT TCA TTA AAT CCA ATT ATT GCA ACA GCT GCT ATT AAT Ala Thr Val Arg Ser Leu Asn Pro Ile Ile Ala Thr Ala Ala Ile Asn 420 425 430	1392
35 GGT AGT GAG CTC CTT GTC ACA GCT AAT GCT GGC CAA TCT GGA AAA GCT Gly Ser Glu Leu Leu Val Thr Ala Asn Ala Gly Gln Ser Gly Lys Ala 435 440 445	1440
40 TCA TTT GAA GTA ACA TTA AAA GAT AAT ACA AAA AGA ACA TTT ACA GTT Ser Phe Glu Val Thr Leu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Thr Phe Thr Val 450 455 460 465	1488
45 GAT GTA AAA AAA GAC CCT GTA TTA CAA GAT ATA AAA GTA GAT GCA ACT Asp Val Lys Asp Pro Val Leu Gln Asp Ile Lys Val Asp Ala Thr 470 475 480	1536
50 TCT GTT AAA CTT TCC GAT GAA GCT GTT GGC GGC GGG GAA GTT GAA GGA Ser Val Lys Leu Ser Asp Glu Ala Val Gly Gly Glu Val Glu Gly 485 490 495	1584
55 GTT AAC CAA AAA ACG ATT AAA GTA AGT GCA GTT GAC CAA TAC GGT AAA Val Asn Gln Lys Thr Ile Lys Val Ser Ala Val Asp Gln Tyr Gly Lys 500 505 510	1632
60 GAA ATT AAA TTT GGT ACA AAA GGT AAA GTT ACT GTT ACA ACT AAT ACA Glu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Gly Lys Val Thr Val Thr Asn Thr 515 520 525	1680
65 GAA GGA CTA GTT ATT AAA AAT GTA AAT AGC GAT AAT ACA ATT GAC TTT Glu Gly Leu Val Ile Lys Asn Val Asn Ser Asp Asn Thr Ile Asp Phe 530 535 540 545	1728
70 GAT AGC GGC AAT AGT GCA ACT GAC CAA TTT GTT GTC GTT GCA ACA AAA Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys 550 555 560	1776
75 GAC AAA ATT GTC AAT GGT AAA GTA GAA GTT AAA TAT TTC AAA AAT GCT Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala 565 570 575	1824
80 AGT GAC ACA ACA CCA ACT TCA ACT AAA ACA ATT ACT GTT AAT GTA GTA Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val 580 585 590	1872

- 43 -

AAT	GTA	AAA	GCT	GAC	GCT	ACA	CCA	GTA	GGA	TTA	GAT	ATT	GTA	GCA	CCT		1920
Asn	Val	Lys	Ala	Asp	Ala	Thr	Pro	Val	Gly	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Pro		
595					600					605							
5	TCT	AAA	ATT	GAT	GTA	AAT	GCT	CCA	AAC	ACT	GCT	TCT	ACT	GCA	GAT	GTT	1968
Ser	Lys	Ile	Asp	Val	Asn	Ala	Pro	Asn	Thr	Ala	Ser	Thr	Ala	Asp	Val		
610					615					620					625		
10	GAT	TTT	ATA	AAT	TTC	GAA	AGT	GTT	GAG	ATT	TAC	ACA	CTC	GAT	TCA	AAT	2016
Asp	Phe	Ile	Asn	Phe	Glu	Ser	Val	Glu	Ile	Tyr	Thr	Leu	Asp	Ser	Asn		
					630				635				640				
15	GGT	AGA	CGT	CAA	AAA	AAA	GTT	ACT	CCA	ACT	GCA	ACT	ACA	CTT	GTA	GGT	2064
Gly	Arg	Arg	Gln	Lys	Lys	Val	Thr	Pro	Thr	Ala	Thr	Thr	Leu	Val	Gly		
					645				650				655				
20	ACA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	GTT	AAT	GGG	AAT	GTA	TTA	CAA	TTC	AAG	GGG	2112
Thr	Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Asn	Gly	Asn	Val	Leu	Gln	Phe	Lys	Gly			
					660				665				670				
25	AAC	GAA	GAA	TTA	ACG	CTA	TCA	ACT	TCT	TCT	AGT	ACA	GGA	AAC	GTA	GAT	2160
Asn	Glu	Glu	Leu	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Asn	Val	Asp	
					675				680				685				
30	GGA	ACA	GCA	GAA	GGA	ATG	ACA	AAA	CGT	ATT	CCA	GGG	AAA	TAT	ATC	AAC	2208
Gly	Thr	Ala	Glu	Gly	Met	Thr	Lys	Arg	Ile	Pro	Gly	Lys	Tyr	Ile	Asn		
					690				695			700		705			
35	TCT	GCA	AGT	GTA	CCT	GCC	AGT	GCA	ACA	GTA	GCA	ACA	AGT	CCT	GTT	ACT	2256
Ser	Ala	Ser	Val	Pro	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Thr	Ser	Pro	Val	Thr		
					710				715				720				
40	GTA	AAG	CTT	AAT	TCA	AGT	GAT	AAT	GAT	TTA	ACA	TTT	GAA	GAA	TTA	ATA	2304
Val	Lys	Leu	Asn	Ser	Ser	Asp	Asn	Asp	Leu	Thr	Phe	Glu	Glu	Leu	Ile		
					725				730				735				
45	TTC	GGT	GTA	ATT	GAC	CCT	ACA	CAA	TTA	GTC	AAA	GAT	GAA	GAC	ATC	AAC	2352
Phe	Gly	Val	Ile	Asp	Pro	Thr	Gln	Leu	Val	Lys	Asp	Glu	Asp	Ile	Asn		
					740				745				750				
50	GAA	TTT	ATT	GCA	GTT	TCA	AAA	GCG	GCT	AAA	AAT	GAT	GGA	TAT	TTG	TAT	2400
Glu	Phe	Ile	Ala	Val	Ser	Lys	Ala	Ala	Lys	Asn	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr		
					755				760				765				
55	AAT	AAA	CCG	CTT	GTA	ACG	GTT	AAA	GAT	GCA	TCA	GGA	AAA	GTT	ATT	CCA	2448
Asn	Lys	Pro	Leu	Val	Thr	Val	Lys	Asp	Ala	Ser	Gly	Lys	Val	Ile	Pro		
					770				775				780		785		
60	ACA	GGT	GCA	AAT	GTT	TAC	GGT	CTA	AAT	CAT	GAT	GCA	ACT	AAC	GGA	AAC	2496
Thr	Gly	Ala	Asn	Val	Tyr	Gly	Leu	Asn	His	Asp	Ala	Thr	Asn	Gly	Asn		
					790				795				800				
65	ATT	TGG	TTT	GAT	GAG	GAA	CAA	GCT	GGC	TTA	GCT	AAA	AAA	TTT	AGT	GAT	2544
Ile	Trp	Phe	Asp	Glu	Glu	Gln	Ala	Gly	Leu	Ala	Lys	Lys	Phe	Ser	Asp		
					805				810				815				
70	GTA	CAT	TTT	GAT	GAT	TTT	TCA	TTA	ACT	AAC	GTT	GTA	AAA	ACT	GGT		2592
Val	His	Phe	Asp	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Val	Val	Lys	Thr	Gly		
					820				825				830				
75	AGC	GGT	ACA	GTT	TCT	TCA	TCG	CCA	TCA	TTA	TCT	GAC	GCA	ATT	CAA	CTT	2640
Ser	Gly	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Leu	Ser	Asp	Ala	Ile	Gln	Leu		
					835				840				845				
80	ACT	AAT	TCA	GGC	GAT	GCA	GTA	TCG	TTT	ACA	TTA	GTT	ATC	AAA	TCA	ATT	2688
Thr	Asn	Ser	Gly	Asp	Ala	Val	Ser	Phe	Thr	Leu	Val	Ile	Lys	Ser	Ile		
					850				855				860		865		

- 44 -

TAT GTT AAA GGC GCA GAT AAA GAT GAT AAT AAC TTA CTT GCA GCC CCT  
 Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro  
 870 875 880

2736

5 GTT TCT GTC AAT GTG ACT GTG ACA AAA TAA  
 Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys  
 885 890

2766

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 15 (A) LÄNGE: 921 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

25 Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala  
 -31 -30 -25 -20

Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala  
 -15 -10 -5 1

30 Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu  
 5 10 15

Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val  
 20 25 30

35 Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val  
 35 40 45

40 Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val  
 50 55 60 65

Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val  
 70 75 80

45 Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr  
 85 90 95

Arg Val Glu Met Ala Lys Ile Ile Ala Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Ala  
 100 105 110

50 Asp Asp Val Lys Leu Pro Phe Thr Asp Val Asn Asp Thr Trp Ala Pro  
 115 120 125

Tyr Val Lys Ala Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Leu Lys His  
 55 130 135 140 145

Gln Gln Ala Ser Val His Thr Lys Asn Ile Thr Leu Arg Asp Phe Ala  
 150 155 160

60 Gln Phe Val Tyr Arg Ala Val Asn Ile Asn Ala Val Pro Glu Ile Val  
 165 170 175

Glu Val Thr Ala Val Asn Ser Thr Thr Val Lys Val Thr Phe Asn Thr  
 180 185 190

- 45 -

Gln	Ile	Ala	Asp	Val	Asp	Phe	Thr	Asn	Phe	Ala	Ile	Asp	Asn	Gly	Leu	
195						200				205						
Thr	Val	Thr	Lys	Ala	Thr	Leu	Ser	Arg	Asp	Lys	Lys	Ser	Val	Glu	Val	
5	210					215				220				225		
Val	Val	Asn	Lys	Pro	Phe	Thr	Arg	Asn	Gln	Glu	Tyr	Thr	Ile	Thr	Ala	
					230				235				240			
10	Thr	Gly	Ile	Lys	Asn	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Ala	Lys	Glu	Leu	Thr	Gly
					245				250				255			
	Lys	Phe	Val	Trp	Ser	Val	Gln	Asp	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Leu	Asn	Asn
		260					265						270			
15	Ser	Ser	Leu	Lys	Val	Gly	Glu	Glu	Ser	Gly	Leu	Thr	Val	Lys	Asp	Gln
					275				280				285			
20	Asp	Gly	Lys	Asp	Val	Val	Gly	Ala	Lys	Val	Glu	Leu	Thr	Ser	Ser	Asn
	290				295					300				305		
	Thr	Asn	Ile	Val	Val	Val	Ser	Ser	Gly	Glu	Val	Ser	Val	Ser	Ala	Ala
					310				315				320			
25	Lys	Val	Thr	Ala	Val	Lys	Pro	Gly	Thr	Ala	Asp	Val	Thr	Ala	Lys	Val
					325				330				335			
	Thr	Leu	Pro	Asp	Gly	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Thr	Phe	Lys	Val	Thr	Val
		340				345						350				
30	Thr	Glu	Val	Pro	Val	Gln	Val	Gln	Asn	Gln	Gly	Phe	Thr	Leu	Val	Asp
		355				360						365				
	Asn	Leu	Ser	Asn	Ala	Pro	Gln	Asn	Thr	Val	Ala	Phe	Asn	Lys	Ala	Glu
35	370					375				380				385		
	Lys	Val	Thr	Ser	Met	Phe	Ala	Gly	Glu	Thr	Lys	Thr	Val	Ala	Met	Tyr
					390				395				400			
40	Asp	Thr	Lys	Asn	Gly	Asp	Pro	Glu	Thr	Lys	Pro	Val	Asp	Phe	Lys	Asp
						405				410				415		
	Ala	Thr	Val	Arg	Ser	Leu	Asn	Pro	Ile	Ile	Ala	Thr	Ala	Ala	Ile	Asn
						420				425				430		
45	Gly	Ser	Glu	Leu	Leu	Val	Thr	Ala	Asn	Ala	Gly	Gln	Ser	Gly	Lys	Ala
						435				440				445		
	Ser	Phe	Glu	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Asn	Thr	Lys	Arg	Thr	Phe	Thr	Val
		450				455					460			465		
50	Asp	Val	Lys	Lys	Asp	Pro	Val	Leu	Gln	Asp	Ile	Lys	Val	Asp	Ala	Thr
						470				475				480		
	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Asp	Glu	Ala	Val	Gly	Gly	Gly	Glu	Gly		
55						485				490				495		
	Val	Asn	Gln	Lys	Thr	Ile	Lys	Val	Ser	Ala	Val	Asp	Gln	Tyr	Gly	Lys
						500				505				510		
60	Glu	Ile	Lys	Phe	Gly	Thr	Lys	Gly	Lys	Val	Thr	Val	Thr	Thr	Asn	Thr
						515				520				525		
	Glu	Gly	Leu	Val	Ile	Lys	Asn	Val	Asn	Ser	Asp	Asn	Thr	Ile	Asp	Phe
65						530				535				540		545

- 46 -

	Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys			
	550	555	560	
5	Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala			
	565	570	575	
	Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val			
	580	585	590	
10	Asn Val Lys Ala Asp Ala Thr Pro Val Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro			
	595	600	605	
	Ser Lys Ile Asp Val Asn Ala Pro Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asp Val			
	610	615	620	625
15	Asp Phe Ile Asn Phe Glu Ser Val Glu Ile Tyr Thr Leu Asp Ser Asn			
	630	635	640	
20	Gly Arg Arg Gln Lys Lys Val Thr Pro Thr Ala Thr Thr Leu Val Gly			
	645	650	655	
	Thr Lys Lys Lys Lys Val Asn Gly Asn Val Leu Gln Phe Lys Gly			
	660	665	670	
25	Asn Glu Glu Leu Thr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Thr Gly Asn Val Asp			
	675	680	685	
	Gly Thr Ala Glu Gly Met Thr Lys Arg Ile Pro Gly Lys Tyr Ile Asn			
	690	695	700	705
30	Ser Ala Ser Val Pro Ala Ser Ala Thr Val Ala Thr Ser Pro Val Thr			
	710	715	720	
	Val Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asn Asp Leu Thr Phe Glu Glu Leu Ile			
35	725	730	735	
	Phe Gly Val Ile Asp Pro Thr Gln Leu Val Lys Asp Glu Asp Ile Asn			
	740	745	750	
40	Glu Phe Ile Ala Val Ser Lys Ala Ala Lys Asn Asp Gly Tyr Leu Tyr			
	755	760	765	
	Asn Lys Pro Leu Val Thr Val Lys Asp Ala Ser Gly Lys Val Ile Pro			
	770	775	780	785
45	Thr Gly Ala Asn Val Tyr Gly Leu Asn His Asp Ala Thr Asn Gly Asn			
	790	795	800	
	Ile Trp Phe Asp Glu Glu Gln Ala Gly Leu Ala Lys Lys Phe Ser Asp			
50	805	810	815	
	Val His Phe Asp Val Asp Phe Ser Leu Thr Asn Val Val Lys Thr Gly			
	820	825	830	
55	Ser Gly Thr Val Ser Ser Ser Pro Ser Leu Ser Asp Ala Ile Gln Leu			
	835	840	845	
	Thr Asn Ser Gly Asp Ala Val Ser Phe Thr Leu Val Ile Lys Ser Ile			
	850	855	860	865
60	Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro			
	870	875	880	
	Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys			
65	885	890		

- 47 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

  - (A) LÄNGE: 498 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: beides
  - (D) TOPOLOGIE: linear

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

15	CCCATGGACC CGTCCAAGGA CTCCAAAGCT CAGGTTCTG CAGCCGAAGC TGGTATCACT GGCACCTGGT ATAACCAACT GGGGTCGACT TTCATTGTGA CCGCTGGTGC GGACGGAGCT	60 120
	CTGACTGGCA CCTACGAATC TGCGGTTGGT AACGCAGAAT CCCGCTACGT ACTGACTGGC	180
20	CGTTATGACT CTGCACCTGC CACCGATGGC TCTGGTACCG CTCTGGGCTG GACTGTGGCT TGGAAAAACA ACTATCGTAA TGCGCACAGC GCCACTACGT GGTCTGGCCA ATACGTTGGC	240 300
	GGTGCTGAGG CTCGTATCAA CACTCAGTGG CTGTTAACAT CCGGCACTAC CGAAGCGAAT	360
25	GCATGGAAAT CGACACTAGT AGGTCTATGAC ACCTTTACCA AAGTTAACGCC TTCTGCTGCT AGCATTGATG CTGCCAAGAA AGCAGGCGTA AACAAACGGTA ACCCTCTAGA CGCTGTTCAG	420 480
30	CAATAATAAG GATCCCCGG	498

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- 35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

(3) ANGABEN ZU SEO ID NO.: 8.

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- 50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AGGGAAATAT ATCAACTCTG CAAGTG  
60

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von S-Layer-Proteinen,  
durch gekennzeichnet, daß man
  - (a) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure, ausgewählt aus
    - (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis Position 3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
    - (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
    - (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt;
  - (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und
  - (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle gewinnt.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
durch gekennzeichnet,  
daß man eine E.coli-Wirtszelle verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
durch gekennzeichnet,  
daß man das Polypeptid in Form einer assemblierten S-Layer-Struktur aus dem Inneren der Wirtszelle gewinnt.

- 49 -

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure  
eine oder mehrere Insertionen enthält, die für Peptid-  
oder Polypeptidsequenzen kodieren.
5. Verfahren nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Insertionen ausgewählt werden aus Nukleotidse-  
quenzen, die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren  
geladenen Aminosäuren oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epi-  
tope, metallbindende Epitope, immunogene Epitope, aller-  
gene Epitope, antigene Epitope, Streptavidin, Enzyme,  
Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine kodieren.
6. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Insertionen für Streptavidin kodieren.
7. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Insertionen für immunogene Epitope aus Herpesvi-  
ren, insbesondere Herpesvirus 6 oder FMDV, kodieren.
8. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Insertionen für Enzyme, wie etwa Polyhydroxybut-  
tersäuresynthase oder bakterielle Luciferase, kodieren.
9. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Insertionen für Cytokine, wie etwa Interleukine,  
Interferone oder Tumornekrosefaktoren, kodieren.
10. Verfahren nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet,

- 50 -

daß die Insertionen für Antikörper-bindende Proteine,  
wie etwa Protein A oder Protein G, kodieren.

11. Verfahren nach Anspruch 5,  
5 durch gekennzeichnet,  
daß die Insertionen für antigene Epitope kodieren, die  
an Cytokine oder Endotoxine binden.
12. Verfahren nach Anspruch 5,  
10 durch gekennzeichnet,  
daß die Insertionen für metallbindende Epitope kodieren.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,  
15 durch gekennzeichnet,  
daß 5'-seitig der für das S-Layer-Protein kodierenden  
Nukleinsäure in operativer Verknüpfung eine für ein  
gram-positives Signalpeptid kodierende Nukleinsäure an-  
geordnet ist.
- 20 14. Verfahren nach Anspruch 13,  
durch gekennzeichnet,  
daß die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure  
(a) den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ  
ID NO.1 dargestellten Nukleotidsequenz,  
25 (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration  
des genetischen Codes entsprechende Nukleotid-  
sequenz oder/und  
(c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) minde-  
stens 80% homologe Nukleotidsequenz umfaßt.
- 30 15. Nukleinsäure, die für ein rekombinantes S-Layer-Protein  
kodiert und ausgewählt ist aus  
(i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis  
3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gege-  
35 benfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Ab-  
schnitt umfaßt,

- 51 -

- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und  
(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt,  
wobei die Nukleinsäure innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält.

10

16. Nukleinsäure nach Anspruch 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Insertionsstelle an Position 582, 878, 917, 2504  
oder/und 2649 der in SEQ ID No. 1 gezeigten Nukleotidsequenz lokalisiert ist.

15

17. Vektor,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach  
Anspruch 15 oder 16 enthält.

20

18. Zelle,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16  
oder einem Vektor nach Anspruch 17 transformiert ist.

25

19. Zelle nach Anspruch 18,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie eine gram-negative prokaryontische Zelle, insbesondere eine E.coli-Zelle ist.

30

20. Zelle nach Anspruch 18 oder 19,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie eine rekombinante S-Layer-Struktur enthält.

35

21. Rekombinantes S-Layer-Protein,  
dadurch gekennzeichnet,

- 52 -

daß es von einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 kodiert ist.

22. Rekombinante S-Layer-Struktur,  
5 durch gekennzeichnet,  
daß sie als Untereinheit mindestens ein Protein nach Anspruch 21 enthält.
23. S-Layer-Struktur nach Anspruch 22,  
10 durch gekennzeichnet,  
daß sie weiterhin als Untereinheit mindestens ein nicht-modifiziertes S-Layer-Protein enthält.
24. S-Layer-Struktur nach Anspruch 22 oder 23,  
15 durch gekennzeichnet,  
daß sie mehrere kovalent oder durch Affinitätsbindung miteinander verknüpfte Schichten umfaßt.
25. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 21 oder  
20 einer S-Layer-Struktur nach einem der Ansprüche 22 bis 24 als Vakzin oder Adjuvans.
26. Verwendung nach Anspruch 25,  
25 durch gekennzeichnet,  
daß das Vakzin oder Adjuvans weiterhin einen Bakterien-ghost umfaßt, der gegebenfalls in seiner Membran weitere immunogene Epitope enthält.
27. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 21 oder  
30 einer S-Layer-Struktur nach einem der Ansprüche 22 bis 24 als Enzymreaktor.
28. Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus  
35 (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz ge-

- 53 -

- gebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.
- 10 29. Nukleinsäure nach Anspruch 28,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält.
- 15 30. Vektor,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 28 oder 29 enthält.
- 20 31. Zelle,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 28 oder 29 oder einem Vektor nach Anspruch 30 transformiert ist.
- 25 32. Zelle nach Anspruch 31,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie eine rekombinante S-Layer-Struktur enthält.
- 30 33. S-Layer-Protein,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es von einer Nukleinsäure nach Anspruch 29 kodiert ist.

- 54 -

34. Rekombinante S-Layer-Struktur,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß sie als Untereinheit mindestens ein rekombinantes S-  
Layer-Protein enthält, das von einer Nukleinsäure nach  
Anspruch 29 kodiert ist.
35. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 33 oder  
einer S-Layer-Struktur nach Anspruch 34 als Vakzin oder  
Adjuvans.
36. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 33 oder  
einer S-Layer-Struktur nach Anspruch 34 als Enzymreak-  
tor.
37. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten S-Layer-Pro-  
teinen,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man
  - (a) eine Wirtszelle bereitstellt, die eine für ein S-  
Layer-Protein kodierende Nukleinsäure enthält, die  
innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden  
Bereichs eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende  
Insertion enthält,
  - (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen  
kultiviert, die zu einer Expression der  
Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon ko-  
dierten Polypeptids führen, und
  - (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle  
oder dem Kulturmedium gewinnt.
38. Verfahren nach Anspruch 37,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende  
Nukleinsäure ausgewählt wird aus
  - (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis  
3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gege-

- 55 -

benenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Ab-schnitt umfaßt,

- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und  
5 (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

10 39. Verfahren nach Anspruch 37,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ausgewählt wird aus

- 15 (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Ab-schnitt umfaßt,  
  
(ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und  
20 (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

25 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 37-39,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß in der Wirtszelle ein weiteres S-Layer-Gen exprimiert wird, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert.

30

41. Verfahren nach Anspruch 40,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß das nichtmodifizierte S-Layer-Protein in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompa-tible S-Layer-Struktur auszubilden.

- 56 -

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 37-39,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß in der Wirtszelle kein weiteres S-Layer-Gen exprimiert wird, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert, welches in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden.
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 37-42,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man eine prokaryontische Wirtszelle verwendet.
44. Verfahren nach Anspruch 43,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man eine gram-positive Wirtszelle verwendet.
45. Verfahren nach Anspruch 44,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man *B.stearothermophilus* verwendet.

Fig. 1

1 / 3

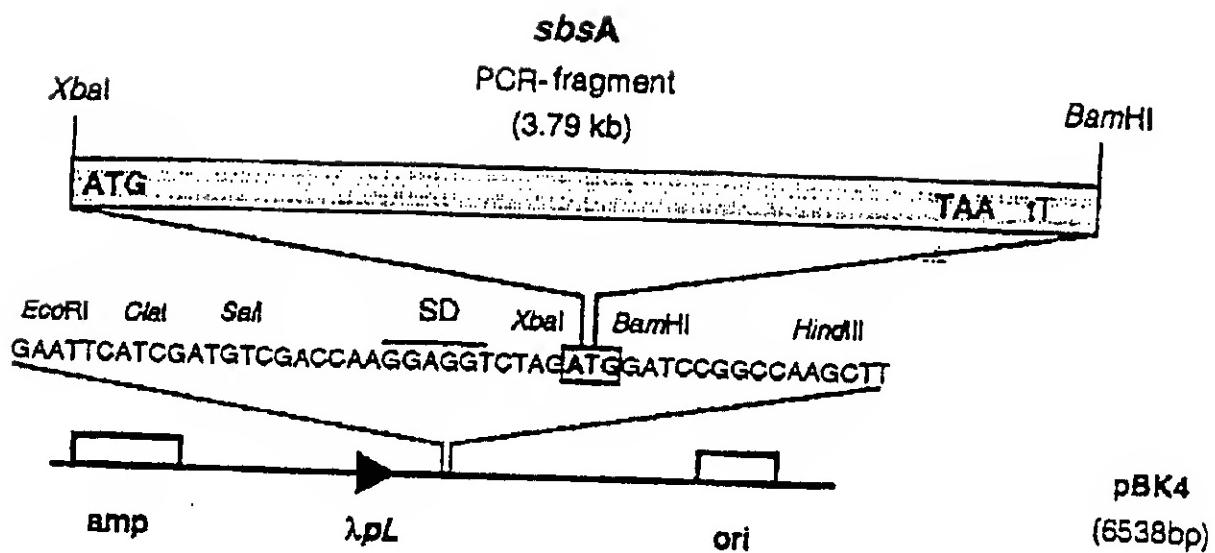


Fig.2

2/3

A)



B)

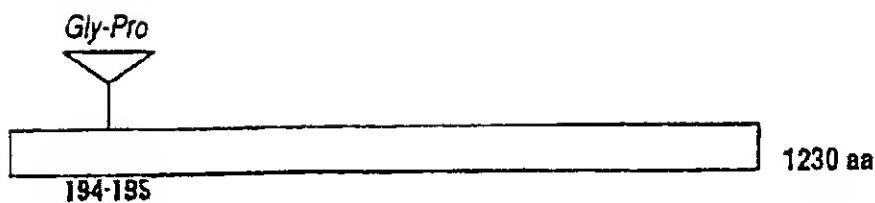
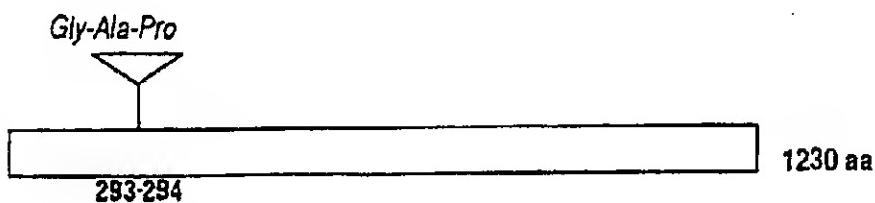
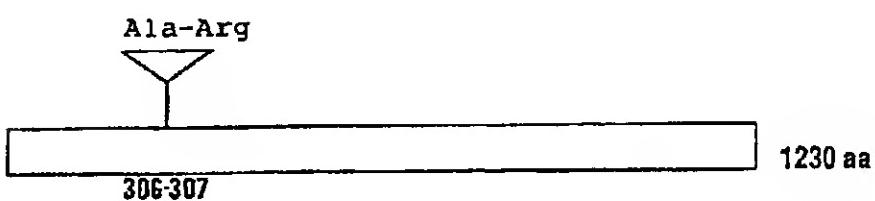
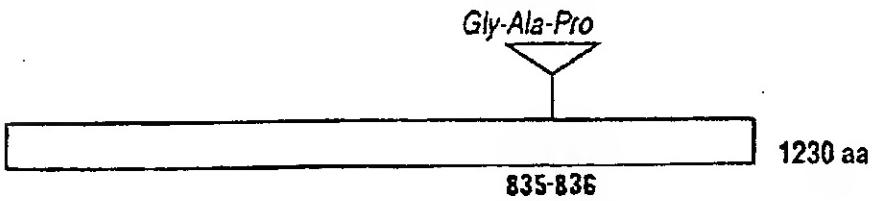


C)



**Fig.3**

3/3

**A)****B)****C)****D)****E)**